

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El Reglamento de Graduación de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Capítulo VI, Art. 46

**“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la
Universidad para fines de divulgación”**

Publicado bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

UNIVERSIDAD “DR. JOSE MATIAS DELGADO”
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DR. LUIS EDMUNDO VASQUEZ
ESCUELA DE MEDICINA

TESIS DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN MEDICINA

**MODELO ANIMAL: EFECTO DEL PLASMA RICO
EN PLAQUETAS EN LA REGENERACION TISULAR
DE QUEMADURAS DE SEGUNDO GRADO.**

AUTORES

Astrid Irene Abrego García.
Elena María Abrego Portillo.
Charlene Elizabeth Naves Canizales.

ASESOR

Dr. William Hoyos Arango.

2012.

DEDICATORIA

A todos los estudiantes de medicina y colegas que buscan enamorarse de la medicina a través de la investigación.

A todos los pacientes que nos inspiran a luchar por su salud y llevar nuestros conocimientos al límite por medio de la ciencia y de la mano de Dios.

AGRADECIMIENTO

A Dios por acompañarme durante mi vida y a lo largo de mi carrera permitiendo que alcanzara mis metas. Por darme la fuerza en mi corazón para ver y vivir las diversas condiciones humanas, siendo testigo de la muerte pero también de la vida, reconociendo los límites de la ciencia y la infinidad de su amor y voluntad.

Gracias a mi papa por enseñarme la perseverancia y dedicación al trabajo y al estudio.

A mi mama por ser un pilar en mi vida, por apoyarme a lo largo de los años y por hacerme ver la voluntad de Dios en todas las cosas y así lograr seguir adelante en momentos que parecía imposible.

A mi hermano quien me hacía ver el lado simple de la medicina y la complejidad del paciente. A mi esposo quien me dio su amor, comprensión y paciencia a lo largo de mi carrera. Por llenarme de fuerza para vencer los diferentes obstáculos y brindarme su incondicional apoyo. Por compartir mi amor a la medicina y llenar mis días de alegría.

A mis mejores amigas y compañeras en la elaboración de esta tesis, con quienes compartí incontables horas de trabajo y con las cuales descubrí la aventura de la investigación.

A nuestros profesores y mentores en las diferentes áreas que nos transmitieron su conocimiento de medicina y dedicación al paciente.

Charlene E. Naves Canizales

AGRADECIMIENTO.

A Dios que en sus planes perfectos se encuentra mi vida y el destino por el que me ha guiado y respaldado cada uno de los días de este viaje, sabiendo que el propósito al que me ha llamado no solo el sanar cuerpos sino también almas.

A mi Mamá quien es mi heroína quien ha luchado por mí toda su vida; que es el motor de mi vida que me ha apoyado, alentado y guiado, quien se ha mantenido a mi lado en todas las circunstancias que he afrontado.

A mi Papá que en este momento ya no está conmigo pero sé que ahí en la presencia de Dios donde hoy se encuentra está orgulloso de mí.

A Nelly quien me inspira a ser valiente y esforzada en cada escenario que nos presenta la vida y de transmitir el amor por el prójimo viéndolo a través de los ojos de Jesucristo.

A Alejandra quien es mi amiga y en más de una ocasión ha sido mi paciente, paño de lágrimas, audiencia, mi crítica y quien me corrige.

Y en especial mención a Carlos Fernando quien es mi aliciente del día a día, la razón por la que lucho, por la que me esfuerzo y el rostro que veo en cada niño que trato, quien con sus miradas y abrazos ha hecho brillar el sol aun en los días más nublados.

A mis amigas que han compartido esta travesía conmigo, que me brindaron más que amistad una hermandad.

A mis catedráticos que me transmitieron esa pasión por la medicina, la responsabilidad de ejercerla y de velar por el bienestar de aquellos que con toda FÉ ponen sus vidas en nuestras manos.

Astrid Irene Abrego García.

AGRADECIMIENTO.

A Dios por permitirme realizar este trabajo y acompañarme en cada instante de la carrera y permitirme concluirlo con satisfacción.

A mi familia Concepción Portillo, María Elena de Abrego, Rubén Abrego, mi hermano Juan Carlos y mi abuelita María Dolores por acompañarme y cuidarme a lo largo de mi vida, apoyar mis decisiones y darme todo el amor del mundo, porque sin su presencia este trabajo y este título no habrían sido posibles. Gracias por compartir mi vida y logros, esta tesis también es de uds.

A Ramiro el amor de mi vida quien me ha cuidado y apoyado siempre, gracias por confiar en mí, sin sus consejos no habría concluido mi carrera de esta manera.

A mis amigas porque además de todos los conocimientos que la universidad me brindó en estos años, también me regalo a las mejores amigas del mundo, en las buenas y en las malas.

Y finalmente pero no menos importante a mis docentes que nos han guiado en nuestro aprendizaje y en especial al Dr. William Hoyos a quien agradezco su paciencia, sus consejos y por enseñarnos el amor a la investigación, sin ud este trabajo no habría sido posible.

Elena María Abrego Portillo

I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. JUSTIFICACIÓN	10
III. DEMILITACIÓN DEL PROBLEMA.....	11
IV. OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL:.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	12
V. MARCO TEÓRICO.....	13
5.1 LA PIEL	13
5.1.1 EPIDERMIS.....	13
5.1.2 DERMIS.....	14
5.2 QUEMADURAS.....	14
5.2.1 CLASIFICACIÓN	15
5.2.2 RESPUESTA FISIOLÓGICA ANTE UNA QUEMADURA	17
5.2.3 MANEJO DE QUEMADURAS	18
5.3 PROCESO DE CICATRIZACIÓN	21
5.3.1 HEMOSTASIS.....	21
5.3.2 INFLAMACIÓN	22
5.3.3 PROLIFERACIÓN.....	22
5.3.4 PRODUCCIÓN DE MATRIZ Y COLÁGENO	23
5.3.5 REEPITELIZACIÓN	24
5.3.6 REMODELACIÓN	25
5.4 PLASMA RICO EN PLAQUETAS	25
5.4.1 COMPONENTES DEL PRP	26
PLAQUETAS	26
REGULACIÓN DE LA ADHESIÓN Y AGREGACION PLAQUETARIA	28
5.4.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	30
5.4.3 APLICACIONES DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	34
5.4.4 EFECTOS ADVERSOS DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	35
VI. METODOLOGÍA.....	37
6.1 HIPÓTESIS:	37
6.2 TIPO DE ESTUDIO:.....	37

6.3 POBLACIÓN UNIVERSAL Y MUESTRA:	37
6.3.1 Criterios de inclusión:	37
6.3.2 Criterios de exclusión:	37
6.3.3 Tipo de muestreo:	37
6.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:	38
6.5 METODOS Y TÉCNICA:	39
6.5.1 Preparación de los animales:	39
6.5.2 Extracción sanguínea:	39
6.5.3 Realización de la injuria térmica.....	39
6.5.4 Obtención del PRP:	40
6.5.5 Recuento de Plaquetas.	41
6.5.6 Aplicación del PRP:.....	41
6.5.7 Cuidado periódico de las lesiones.	41
6.5.8 Toma de biopsia.....	42
6.5.9 Toma de fotografías	42
6.5.10 Procesamiento y análisis de datos	42
6.5.11 Consideraciones éticas	43
VII RESULTADOS Y ANÁLISIS	44
7.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
7.2 RESULTADOS MACROSCÓPICOS	49
7.3 DISCUSIÓN	51
VIII CONCLUSIONES	54
IX RECOMENDACIONES:	55
BIBLIOGRAFIA	56

I. INTRODUCCIÓN

La lesión tisular generada por una quemadura involucra la activación de múltiples procesos fisiológicos cuyas manifestaciones son más o menos evidentes según el grado de extensión de afectación sistémica. Son frecuentes manifestaciones como la pérdida de proteínas, presentación de infección y en general la respuesta fisiológica del paciente tal y como ocurre en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que puede conducir a disfunción multiorgánica y otros fenómenos de gravedad que elevan la mortalidad hasta porcentajes entre el 80% y el 100%.^{(1) (2)}

Las intervenciones tempranas que permitan impactar positivamente en la recuperación del paciente quemado y sus múltiples condiciones clínicas, cuyo proceso de reparación es determinante del éxito en los primeros momentos después de la injuria.

La investigación actual señala un campo prometedor en la regeneración tisular mediante el uso del plasma rico en plaquetas; material autólogo que posee concentraciones superiores de factores de crecimiento en las plaquetas que no solo cumplen con su papel hemostático sino también interfieren en la regulación, pro inflamación, liberación de citocinas y factores involucrados en el inicio de regeneración.⁽³⁾

Por lo que resulta interesante esta propuesta de material bioactivo, autólogo y económico que conlleva a la regeneración de múltiples componentes de tejidos, el Plasma Rico en Plaquetas.^{(3) (4)}

II. JUSTIFICACIÓN

El Objetivo de cualquier estrategia de manejo de una agresión de tejidos, ya sea esta una herida, quemadura u otra, debe estar orientado a obtener un cierre adecuado en un plazo razonable de tiempo, sin comprometer la función normal. ⁽³⁾

Las quemaduras son un problema multidimensional acarreadoras de consecuencias tanto físicas y emocionales, que en la mayoría de las ocasiones requiere de un tratamiento y recuperación prolongados. El tiempo requerido para la reparación y recuperación temprana posterior a la agresión tisular ocasionada por quemaduras parece determinar el éxito del tratamiento, disminuir la aparición de complicaciones y reducir los costos.

En la actualidad, Las quemaduras constituyen una afección característica de los extremos de la vida, siendo para la población infantil una de las 5 principales causas de muerte. ⁽⁴⁾ En Estados Unidos los adultos mayores constituyen un 9.9% de admisiones a unidades de quemados, de las cuales en un 61.5% ocurren en el hogar. ⁽⁵⁾

Ya que la agresión a los tejidos tiene como resultado su alteración, respondiendo el organismo con un proceso de restauración del tejido afectado que no respeta la arquitectura ni funciones originales ni preexistentes, es decir reparación de la lesión, pero bajo ciertas circunstancias se logra una regeneración, en la cual se crea un tejido similar al original con una arquitectura y función exactamente iguales.⁽³⁾

En Estados Unidos para el año 2003, 92500 niños recibieron atención médica en las salas de emergencia por lesiones causadas por quemaduras, de las cuales 58.100 fueron térmicas. ⁽⁶⁾

En Latinoamérica 7 millones de niños sufren quemaduras cada año, de los cuales al menos 500,000 requieren rehabilitación⁽⁷⁾. En El Salvador las quemaduras ocupan el 1% de la mortalidad afectando a niños menores de 5 años en un 80% siendo la causa principal de quemaduras térmicas. ⁽⁶⁾En el año 2007 en el mes de diciembre estas generaron un alza de los costos de tratamiento total de aproximadamente \$300,000 en 10 días. ⁽⁸⁾

El abordaje de las quemaduras requiere intervenciones que garanticen la rápida recuperación del paciente, la reducción de la estancia hospitalaria y la temprana rehabilitación, este abordaje de la injuria tisular hace uso de una nueva estrategia terapéutica, la cual es el plasma rico en plaquetas que en múltiples áreas ha demostrado facilitar la cicatrización de las quemaduras, cirugía cosmética, cirugía plástica, cirugía dental, cirugía ortopédica y cirugía cardiorábrica ya que posee factores de crecimiento secretados activamente por las plaquetas con el propósito de iniciar un proceso de regeneración más eficiente.

El presente trabajo busca dar solución al siguiente interrogante: ¿Ofrecerá alguna ventaja en quemaduras térmicas de segundo grado, la aplicación de PRP en comparación al proceso natural de cicatrización y al uso de terapia convencional?

III. DEMILITACIÓN DEL PROBLEMA

A través de los años se han podido identificar diversos métodos para lograr promover la cicatrización cuando se presenta una injuria; los cuales aportan factores que originan dicho proceso de forma natural o artificial, algunas aun se encuentran en estudio y otras ya son ampliamente conocidas.

El presente trabajo evaluará el uso de plasma rico en plaquetas mediante la inyección subcutánea del mismo en un modelo animal de quemaduras térmicas de segundo grado, mediante la evaluación macroscópica y microscópica en forma cuantitativa.

Como parámetro inicial se promediará la concentración de plaquetas del plasma rico en plaquetas obtenido por el método propuesto, la medición de los parámetros inherentes al proceso de regeneración mediante la medición del área de las quemaduras las cuales se analizarán durante la intervención experimental los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15.

Los parámetros histológicos investigados mediante microscopía óptica de luz serán evaluados con biopsias tomadas el día 15 después de realizada la injuria para valorar angiogénesis, reepitelización y depósitos de colágeno así mismo se valorará colonias bacterianas presentes en la muestra.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el efecto del plasma rico en plaquetas sobre la regeneración tisular en quemaduras de segundo grado en un modelo animal.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar el modelo de quemaduras de espesor parcial profundo en conejos.
- Determinar el papel del PRP sobre la rapidez de cicatrización en quemaduras de segundo grado.
- Comprobar la capacidad de reepitelización y angiogénesis del PRP.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 La Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y tiene diversas funciones entre las que se pueden mencionar de barrera protectora, amortiguador ambiental, sistema de comunicación, termorregulación entre otras.

Se divide tradicionalmente en tres capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

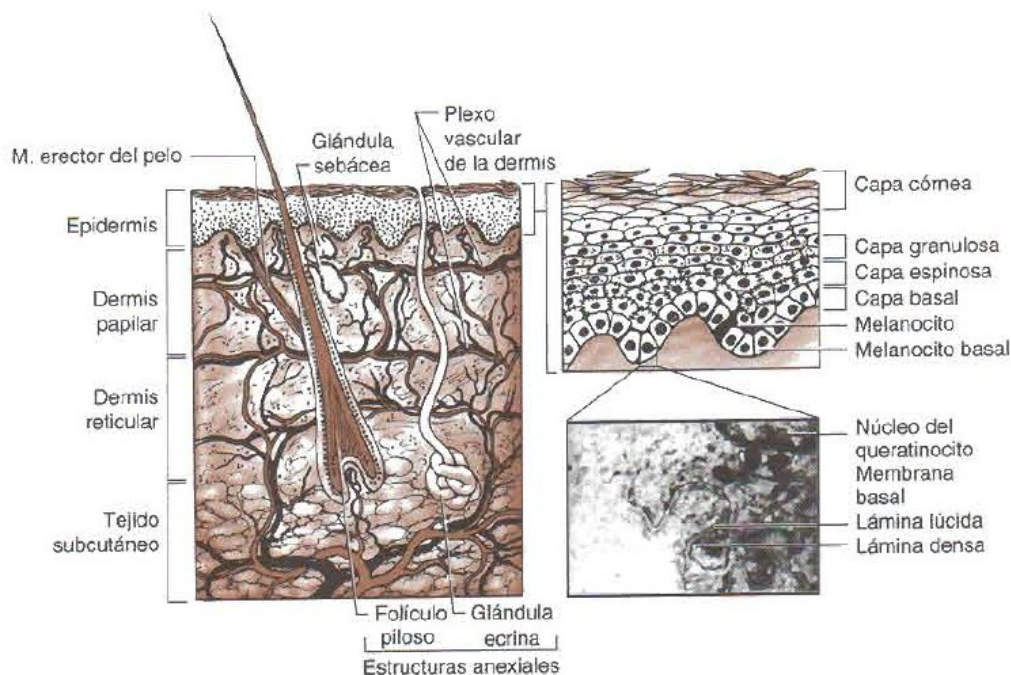


Ilustración 1 La piel, capas y anexos.⁽⁹⁾

5.1.1 EPIDERMIS

Se compone de células con poca matriz extracelular y cada célula tiene una función específica. Los queratinocitos sirven como barrera mecánica, los melanocitos protegen contra radiación y las células de Langerhans constituyen una barrera inmunitaria.

La epidermis es la parte más superficial de la piel, consta de epitelio escamoso estratificado queratinizado, con un espesor de aproximadamente 0.4-1.5mm, siendo más gruesa en zonas como en las palmas o plantas, y más delgada en áreas delicadas como los párpados. Los queratinocitos son las células predominantes en esta capa y son derivadas del ectodermo, constituyen cerca del 80% de todas las células de la epidermis y con un tiempo de tránsito entre los 40 y 56 días. Esta consta de 4 estratos excepto en las palmas de las manos y plantas de los pies.

Las capas epidérmicas de la más profunda a la más superficial son: basal o germinativa, espinosa, granulosa y córnea.

Las células basales profundas tienen actividad mitótica y forman una capa unicelular de queratinocitos poco diferenciados, que luego empiezan a ascender. Al llegar a la capa espinosa pierden su capacidad mitótica y en ese momento son diferenciadas y al empezar a acumular gránulos son llamados queratohialinos en la capa granulosa. Por último se llega a la capa córnea donde los queratinocitos envejecen y pierden las conexiones intercelulares y las células muertas se eliminan.

El estrato lúcido consiste en una zona de transición entre la capa granulosa y la capa córnea, solo presente en palmas de las manos y plantas de los pies.

5.1.2 DERMIS

Esta constituye la parte más voluminosa de la piel y el 70% de su peso es constituido por el colágeno, que se encarga de la fuerza tensional. La piel contiene sobre todo tipo I y la dermis fetal tipo III.

Los fibroblastos están dispersos por toda la dermis y se encargan de la producción y conservación de la matriz proteínica. La dermis también contiene estructuras vasculares, glándulas sudoríparas, folículos pilosos y terminaciones nerviosas.

En ella se pueden diferenciar dos regiones: 1) la dermis papilar y 2) la dermis reticular.

La dermis papilar constituida por fibras de colágeno de pequeño calibre y fibras elásticas de oxitalán, tiene una densidad alta de fibroblastos y mayor actividad metabólica que la dermis reticular.

La dermis reticular contiene fibrillas de colágeno de mayor calibre entrelazadas con fibras de tejido elástico maduras y ramificadas que poseen mayor elasticidad y resistencia.

Tejido celular subcutáneo

Está formada por lipocitos, dispuestos en lobulillos separados por trabéculas de tejido conectivo; está situada justo por debajo de la dermis y limitada por la fascia profunda.

Entre sus funciones podemos mencionar que ayuda a amortiguar el trauma, sirve de barrera térmica y almacena calorías.

5.2 QUEMADURAS

En Estados Unidos, alrededor de 1.2 millones de personas requieren asistencia médica debido a quemaduras cada año, 51,000 de ellas requieren ingreso hospitalario. Un 30-40% de los cuales son menores de 15 años. ⁽¹⁰⁾

Entendemos por quemadura cualquier agresión cutánea que implique una variación térmica local ⁽¹¹⁾ la cual provoca una necrosis congelativa de la epidermis y tejidos subyacentes, su profundidad depende de

la temperatura de exposición de la piel y de la duración de la exposición, aunque otros factores como el grosor de la piel también son importantes. (12) (13)

Las quemaduras se dividen en 3 zonas llamadas también zonas de Jackson mostradas en la figura:

- a) Zona de coagulación que se define como la zona necrótica de la quemadura (12) este es el tejido blanco de la lesión provocado por acción térmica directa cuyo daño es irreversible debido a que hay una destrucción vascular completa (14).
- b) Zona de estasis que se encuentra inmediatamente alrededor de la zona de coagulación y se caracteriza por presentar un daño moderado con disminución de la perfusión tisular (12), esta puede presentar una interrupción del flujo sanguíneo durante las primeras 24hrs de la agresión y por tanto convertirse en tejido necrótico el cual se hace indistinguible del tejido presente en la zona de coagulación esto ocurre por diferentes factores tales como el daño directo del calor o factores indirectos como deshidratación celular y microtrombosis, (14) esta además es especialmente susceptible como hipoperfusión, infección y edema. (15)
- c) Zona hiperemia en la cual se presenta vasodilatación debido a inflamación que rodea la quemadura (12) y se recupera completamente (14) al menos que se presenten ciertos factores como hipoperfusión prolongada y sepsis severa. (15)

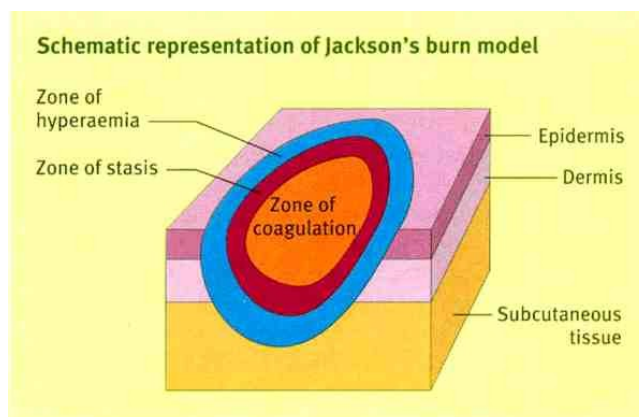


Ilustración 2 Modelo de Quemadura de Jackson(16)

5.2.1 CLASIFICACIÓN

Las quemaduras se clasifican según su etiología (17):

- Escaldaduras.
- Calor (flama).
- Eléctricas.
- Químicas.
- Térmica - Calor.

Según su profundidad las podemos dividir en:

Primer grado.

Son lesiones limitadas a epidermis, caracterizadas por presentar hiperalgesia, eritema, sequedad y blanquean al tacto. Presenta curación espontánea en menos de una semana con descamación superficial y rápida reepitelización. Su etiología más frecuente son las quemaduras de sol, contacto muy breve con sólidos o líquidos calientes y chispas. ⁽¹¹⁾

Segundo grado.

Son lesiones que involucran a epidermis y dermis. Estas pueden ser:

Superficiales: caracterizadas por provocar hiperalgesia, eritema, aparecimiento de vesículas y blanquean al tacto ⁽¹¹⁾. En su evolución natural ocurre reepitelización espontánea a partir de estructuras dérmicas conservadas en la cresta reticular como glándulas sudoríparas y folículos pilosos en 7-14 días ⁽¹²⁾. Estas se presentan al tener contacto breve con líquidos, sólidos y fuego directo ⁽¹¹⁾.

Profundas: estas son lesiones pálidas, no blanquean al tacto, ocurre hipoalgesia aunque si presentan dolor a la punción ⁽¹¹⁾. Reepitelizan a partir de queratinocitos de folículos pilosos y glándulas sudoríparas, a menudo con fibrosis grave como resultado de la pérdida de la dermis en 14-35 días ⁽¹²⁾. Se presentan al entrar en contacto prolongado con sólidos o líquidos (inmersión), fuego directo, químicos ⁽¹¹⁾.

Tercer grado.

Llamadas también de grosor total, estas involucran epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo. Se caracterizan por presentar escara dura, coriácea indolora y negra, blanco o rojo cereza ⁽¹²⁾. Estas no presentan proceso de reepitelización a excepción de los bordes de la herida, por lo cual requieren injerto, tiempo de cicatrización “razonable”. Su etiología principal es el contacto prolongado con sólidos o líquidos (inmersión), fuego directo, químicos y electricidad ⁽¹¹⁾.

Cuarto grado.

Afectan órganos por debajo de la piel como: músculos, hueso, encéfalo, estas al igual que las de tercer grado requieren injerto ⁽¹²⁾, además de debridar la zona y otros cuidados especiales. Se presentan únicamente al entrar en contacto con fuego directo y electricidad ⁽¹¹⁾.

Según la Asociación Americana de Quemaduras requieren tratamiento en unidad de quemadura ⁽¹⁸⁾ las consideradas como graves, las cuales son:

- Quemadura de 2° y 3° mayor de 10% en menores de 10 años y mayores de 50 años.
- Quemaduras de 2° y 3° del 20% en otros grupos etarios.
- Quemadura de 3° mayor de 5% en cualquier grupo etario.
- Quemaduras de 2° que involucren un compromiso severo de la función y estético, especialmente Las que comprendan cara, manos, pies, genitales, periné y articulaciones mayores.
- Lesiones por inhalación.

- Quemaduras eléctricas.
- Lesiones químicas que involucren un compromiso severo de función y estético.
- Injurias asociadas a cualquier trauma en el cual la quemadura incrementa el riesgo de morbilidad o mortalidad como TCE, Fracturas.
- Quemaduras asociadas a enfermedades importantes preexistentes importantes que compliquen su manejo, prolonguen la recuperación, o afecte la mortalidad.
- Quemaduras circunferenciales.

5.2.2 RESPUESTA FISIOLÓGICA ANTE UNA QUEMADURA

Los pacientes quemados con o sin una lesión por inhalación suelen presentar un proceso inflamatorio conocido como SIRS. Además hay alteraciones patológicas de los sistemas metabólico, cardiovascular, gastrointestinal y de la coagulación dando como resultado un hipermetabolismo.

5.2.2.1 Choque por quemadura

Es un proceso complejo en el que ocurre disfunción circulatoria y microcirculatoria de difícil reanimación con líquidos. El traumatismo tisular y el choque hipovolemico conducen a la producción y liberación de mediadores locales y sistémicos, incrementando la permeabilidad vascular y la presión hidrostática microvascular. ⁽⁹⁾

5.2.2.2 Respuesta metabólica a la quemadura

El gasto de energía en reposo después de una quemadura puede ser hasta 100% mayor a las cifras basales estándar para talla, edad, sexo y peso que puede deberse a un incremento en la pérdida de calor y aumento de la actividad adrenérgica. ⁽⁹⁾

El índice basal de producción de glucosa se eleva a pesar del estado hiperinsulinémico del paciente quemado, que puede definirse como resistencia hepática a la insulina. Por lo que puede complicarse el tratamiento inmediato, aumento de mortalidad y disminución de captación de injertos. ⁽⁹⁾

Al igual que la glucosa, la liberación de ácidos grasos excede las necesidades y se convierten en triglicéridos causando una acumulación de grasa hepática llevando a una esteatosis hepática a largo plazo⁽⁹⁾

La proteólisis se incrementa a un ritmo tal que en la fase aguda supera la producción hepática. La cicatrización de la herida demanda un incremento de la síntesis de proteínas y la actividad inmunitaria. Por lo que a los pacientes con lesiones térmicas se recomienda un consumo >1gr/kg/día y para los enfermos quemados con función renal normal de 2gr/kg/día.

5.2.2.3 Respuesta neuroendocrina a una quemadura

Las catecolaminas se elevan en grandes cantidades después de una lesión por quemadura y son los principales mediadores del hipermetabolismo. La hormona de crecimiento (GH) se atenúa después de la lesión térmica.

Por otro lado los valores séricos totales de Tironina (T3) y Tiroxina (T4) se reducen y los T3 inversa se elevan mientras que quizá las concentraciones celulares sean normales. ⁽⁹⁾

5.2.2.4 Respuesta inmunológica a una quemadura

El sistema inmune del paciente tiene un efecto marcado en el resultado final de supervivencia y morbilidad mayor. Los mediadores se liberan de los tejidos lesionados y sanos para ejercer efectos locales y sistémicos. Después de la quemadura se induce la liberación de citocinas entre las cuales podemos mencionar TNF, IL-1, IL-6 cuyo tiempo de liberación es similar al del paciente quemado o herido. Su rol más importante es la inducción de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda que incluye productos antibacteriales tal como la α -glicoproteína, C3 y fibronectina. La mayor parte del ácido araquidónico es producido por la prostaglandina E2 (PGE2), de los macrófagos y endotoxinas. La cual ejerce su efecto primordialmente por la inhibición de IL-2 producto de las células T activadas e IL-6. La inducción de la cascada es compleja y depende de por lo menos dos factores, una los canales de calcio dependiente y otros calcio independientes. (9)

5.2.3 MANEJO DE QUEMADURAS

Prehospitalario:

Lo primero es sospechar siempre lesiones por inhalación, por lo cual se debe administrar oxígeno al 100%, posteriormente se debe retirar ropa, anillos, relojes, joyas y cinturones porque pueden conservar calor y provocar un efecto torniquete, colocar agua limpia a temperatura ambiente en los 15 minutos siguientes para disminuir la profundidad, pero se debe evitar enfriar la herida para evitar hipotermia. Se procede a la valoración inicial, dentro de la valoración primaria se identifican y corrigen problemas de riesgo vital (ABC). En la valoración secundaria se hace un examen físico completo (12) El tratamiento pre hospitalario de la herida es únicamente protección del medio ambiente, colocando apósitos limpios y secos, no utilizar apósitos húmedos, envolver al paciente para evitar la pérdida excesiva de calor y controlar su temperatura durante el traslado. (12)

Porcentaje de superficie corporal quemada el cual se calcula con la regla de los 9 de Wallace

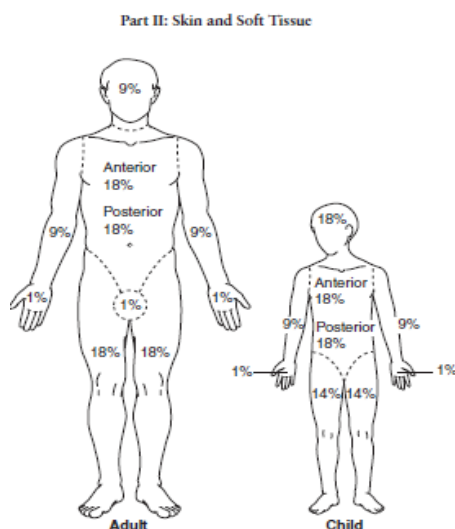


Ilustración 3 Superficie Corporal Quemada; Regla de los 9. (18)

El cálculo del porcentaje de superficie corporal quemado nos es de gran utilidad también para estimar el pronóstico de vida de un paciente quemado y se calcula en base al Índice de Baux ⁽¹⁷⁾:

Tabla 1 Índice de Baux ⁽¹⁶⁾

Porcentaje de superficie corporal quemada	Porcentaje de sobrevida
< 50 %	90
50 – 75 %	50
76- 100 %	10

5.2.3.1 Agentes tópicos

Desde el momento del ingreso del paciente quemado a los centros hospitalarios estos deben ser limpiados con jabón y agua este procedimiento debe realizarse diariamente, el tejido perdido debe ser debridado y las vesículas aspiradas, vello de cara y cuerpo en áreas comprometidas debe ser rasurado. ⁽¹⁸⁾

Debido a que la barrera protectora ha sido eliminada es necesario agregar al tratamiento un antimicrobiano tópico dependiendo del grado de profundidad de la lesión. ⁽¹⁸⁾

Grado de profundidad		Tratamiento tópico
Quemaduras de primer grado		Lociones corporales hidratantes con aloe vera que promueven la regeneración epidérmica.
Quemaduras de Segundo grado	Superficiales	Agentes hidratantes y antimicrobianos
	Profundas	Agentes anti escara y antimicrobianos, una vez la escara se comienza a levantar e inicia su reepitelización requiere un vendaje optimo con gasa más un antimicrobiano tópico.
Tercer grado		Agentes antimicrobianos tópicos

Tabla 2 Tratamiento en Base al Grado de Quemadura ⁽¹⁸⁾

Es importante destacar que los antibióticos sistémicos profilácticos no tienen ningún papel en el tratamiento de las quemaduras. Por el contrario, el uso de antibióticos profilácticos aumenta el riesgo de infecciones oportunistas. Debido que la escara no tiene micro circulación, no existe un mecanismo para la difusión local de un antibiótico sistémica. En consecuencia, los agentes tópicos deben proporcionar una cobertura de amplio espectro antimicrobiano en el sitio de colonización. ⁽¹⁸⁾

Inicialmente la quemadura es colonizada por staphylococcus y streptococcus de la flora bacteriana normal de la piel, pero posteriormente puede observarse otro tipo de microorganismos como gram negativos. ⁽¹⁸⁾

El más utilizado de los antimicrobianos tópicos es la Sulfadiazina de plata el cual es antimicrobiano de amplio espectro con excelente cobertura contra estafilococos y estreptococos. Sin embargo, la Sulfadiazina de plata no penetra en una escara y por lo tanto es poco útil en el tratamiento de quemaduras infectada. Las heridas tratadas con Sulfadiazina de plata desarrolla una pseudo escara amarillo-grisácea que puede ser fácilmente limpiada en el cuidado de las heridas. Su principal efecto adverso es leucopenia pero aun no está determinado el mecanismo de inducción, aunque esta suele ser auto limitada. (18)

Mafenida es otro agente antimicrobiano de uso común el cual está disponible en forma de crema y, más recientemente una solución al 5%, al igual que la Sulfadiazina de plata, posee amplio espectro tanto para bacterias gram positivos como negativos y además, penetra fácilmente las escaras, por lo que es un excelente agente para el tratamiento de quemaduras infectadas.

Debe ser aplicado 2 veces al día. Su principal efecto adverso es acidosis metabólica, esto debido a que es un potente inhibidor de anhidrasa carbónica, lo cual puede provocar manejo ventilatorio. Además su aplicación es muy dolorosa por lo cual se reserva para quemaduras de tercer grado. (18)

El nitrato de plata es también de uso común, proporciona una cobertura de amplio espectro contra los bacterias gram-positivas y gram-negativas. Es relativamente indoloro en la administración y se debe aplicar cada 4 horas para mantener la humedad de los apósitos. El nitrato de plata tiene dos inconvenientes principales, en primer lugar, provoca manchas negras en todas las superficies que se encuentran en contacto con el incluida la ropa, pisos, paredes y la ropa del personal, en segundo lugar, porque nitrato de plata se prepara en solución salina hipotónica (0,5%), la dilución osmolar puede provocar hiponatremia e hipocloremia. (18)

Bacitracina, neomicina y polimixina B son todos los ungüentos comúnmente utilizadas para la cobertura de las heridas superficiales, ya sea sólo con una gasa o vaselina para acelerar la reepitelización. Estas pomadas también se utilizan de forma rutinaria en el cuidado de quemaduras superficial.

Mupirocina es otro agente tópico que es eficaz en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), debe ser utilizado sólo cuando hay una infección por MRSA probada por cultivo, para evitar el desarrollo de infecciones resistentes. (18)

5.2.3.2 Infecciones cutáneas en quemaduras

Se ha responsabilizado a la herida cutánea como el primer foco de sepsis, pero su importancia ha disminuido notablemente debido a significativos avances en el tratamiento de la herida: necrectomía e injertos precoces, antimicrobianos tópicos, vigilancia microbiológica agresiva y mejor uso de antibioticoterapia, sin embargo las características del tejido necrótico resultante de la quemadura constituye un sitio susceptible de colonización por bacterias tanto de origen endógeno como exógeno, éste tejido es rico en proteínas coaguladas, se encuentra húmedo y al ser avascular, la perfusión en la escara y tejidos próximos es claramente insuficiente dificultando la entrega de oxígeno, nutrientes y células fagocitarias al tejido localizado por debajo de la escara. (19)

Siendo estas condiciones apropiadas para la proliferación bacteriana y penetración de las mismas a través de glándulas y folículos alcanzando el tejido viable; pudiendo ocurrir de forma secuencial o no lo descrito por Mc Mill:

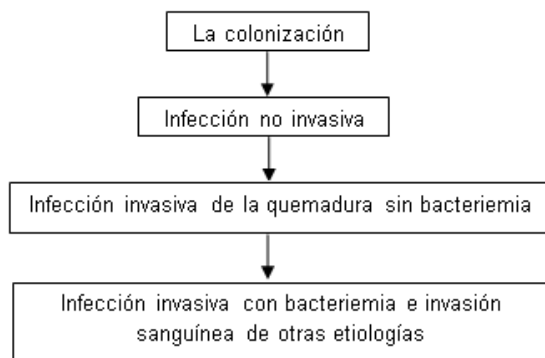


Ilustración 4 Infección Local en Unidad de Quemados ⁽¹⁹⁾

Debido a la dificultad de evaluar la herida por quemadura sobre la base de la observación clínica y los datos de laboratorio, los métodos diagnósticos utilizados son:

Biopsia: es importante para la determinación de infección, puede tomarse guiado por los cambios clínicos, aunque en muchos centros recomiendan tomarlas de forma rutinaria cada 48 horas. La muestra biopsiada debe ser examinada buscando evidencia histológica de invasión bacteriana además de cuantificarla microbiológicamente por cultivo. ⁽¹⁹⁾

Cultivos de frotis superficial: aunque éstos son únicamente el reflejo de la presencia de microorganismos del ambiente intra o extra hospitalario. Aún así los cultivos rutinarios de la herida permiten conocer la flora que coloniza al enfermo y orientan la antibioticoterapia precoz y efectiva cuando aparece la infección clínica. ⁽¹⁹⁾

Entre los principales microorganismos que pueden generar infección en quemaduras tenemos:

- *Streptococcus pyogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomona aeruginosa*
- Otras bacterias gram (-)
- Bacterias anaerobias en quemaduras eléctricas

5.3 PROCESO DE CICATRIZACIÓN

El proceso de cicatrización es un mecanismo complejo el cual incluye diferentes etapas las cuales son coagulación, inflamación y liberación de sustancias y síntesis de matriz celular, angiogénesis, fibroplasia, epitelización, reducción de la herida y remodelación.

Estos procesos de cicatrización se establecen dentro de 4 distintas pero subsecuentes fases:

- a) hemostasia, b) inflamación, c) proliferación y d) remodelación

5.3.1 HEMOSTASIS

Al momento de la herida con una injuria vascular, factores epiteliales y calcio intracelular son liberados, activando así el factor VII e iniciando la vía extrínseca de la cascada de la coagulación; Simultáneamente la vía del ácido araquidónico y la creación de Factores de Crecimiento y Citoquinas trabajan juntas para

iniciar y mantener la fase inflamatoria y la secuencia de las células involucrados en el proceso. Seguido a esto el reflejo de vasoconstricción ocurre para ayudar en la hemostasis, la cual es asegurada por el producto final de la cascada de la coagulación, el tapón de fibrina.

Las fibras del tapón de fibrina actúan como una matriz provisional y es la red en donde ocurrirá la agregación plaquetaria⁽²⁰⁾ además para la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos.⁽²¹⁾

Las plaquetas son importantes también en la síntesis de factores de crecimiento necesarios para la curación de las heridas: el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y el TGF β (factor de crecimiento transformador- β) con acción mitógena y quimiotáctica en los fibroblastos, el TGF α (factor de crecimiento transformador- α) y el EGF (factor de crecimiento epidérmico) que estimulan la reepitelización.⁽²⁰⁾

5.3.2 INFLAMACIÓN

Durante los primeros dos días de cicatrización un proceso inflamatorio es iniciado por la migración de neutrófilos que es responsable de restos del barrido, opsonización de las bacterias mediado por el complemento y posteriormente destrucción de la bacteria por la Mieloperoxidasa (MPO) manejando mecanismos oxidativos.

Los Neutrófilos destruyen las bacterias y descontaminan la herida de residuos externos, las siguientes células atraídas hacia la herida son los linfocitos y los macrófagos, los cuales secretan enzimas incluida la Colagenasa, que debrida la herida, así como Factores de Crecimiento adicionales como TGF- α , TGF- β que estimula los queratinocitos y las plaquetas derivadas de los factores de crecimiento (PDGF), interleucina-1 (IL-1), Factor de Crecimiento fibroblástico (FGF), y Factor de Necrosis Tumoral (TNF), que estimula a los fibroblastos los cuales producen colágeno y promueven la angiogénesis, aproximadamente en el quinto día.⁽²⁰⁾

Dicho proceso conocido también por formación de tejido de granulación se inicia simultáneamente con la fibroplasia.⁽²⁰⁾ En esta etapa los fibroblastos son llevados por macrófagos, TGF- β , y PDGF para proliferación y síntesis de Glicosaminoglicanos y Proteoglicanos; los que constituyen la base de la nueva matriz extracelular del tejido de de granulación y colágeno.⁽²⁰⁾

Los vasos adyacentes a la herida emiten yemas capilares, en cuyo extremo se encuentran las células endoteliales, que al segundo día de iniciado el proceso de cicatrización sufrirán un cambio fenotípico que les permite proyectar pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas y migrar al espacio perivascular.

5.3.3 PROLIFERACIÓN

Este proceso tiene un papel especial el VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial) y las angiopoyetinas (Ang), que interactúan con un receptor de las células endoteliales (Tie 2), volviéndolas más laxas y disminuyendo el contacto de éstas con la matriz para favorecer la acción del VEGF.⁽²⁰⁾

El TGF β estimula la síntesis de fibronectina y proteoglicanos para constituir la matriz provisional, facilita la migración celular e induce el fenotipo de célula endotelial adecuado para la formación de tubos capilares.

Los componentes de la matriz como el SPARC (proteína ácida y rica en cisteína de la matriz celular) liberado por fibroblastos y macrófagos, junto a la trombospondina y la tenascina son considerados proteínas anti adhesivas porque desestabilizan las interacciones célula-matriz, favoreciendo la angiogénesis. Al mismo tiempo la disminución de la tensión de O₂, estimula a los macrófagos para que produzcan y secreten factores angiogénicos.

A medida que las células endoteliales migran hacia el intersticio forman brotes capilares que se dividen en sus extremos y luego se unen formando asas que darán origen a los plexos capilares.

Al cabo de 1 o 2 días después del cese de los estímulos angiogénicos, los capilares sufren una regresión por tumefacción mitocondrial en las células endoteliales de los extremos distales de los capilares, adherencia plaquetaria a las células endoteliales y finalmente ingestión de los capilares necrosados por los macrófagos.

Por último se produce el reclutamiento de las células peri endoteliales (pericitos y células de músculo liso) que van a estabilizar los vasos recién formados. Este proceso se realiza por la unión de la Ang1 al receptor Tie 2, aumentando el contacto de éstas con la matriz. Otros receptores celulares que intervienen son los de integrina, en especial el α vB3, esencial para la formación y mantenimiento de los nuevos vasos. (20)

Este paso marca la transición de la inflamación hacia al proceso de reconstrucción tisular; el cual constituye la fase proliferativa. (20)

5.3.4 PRODUCCIÓN DE MATRIZ Y COLÁGENO

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo y tiene un rol muy importante en la cicatrización satisfactoria de una herida. Hay unos 18 tipos de colágeno, de los cuales los tipos I y III son los principales en el proceso de reparación. El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular en la piel, el tipo III suele encontrarse en la piel y es mas predominante durante un proceso de reparación.

La síntesis de colágeno dependen de factores sistémicos como aporte adecuado de oxígeno, presencia de nutrientes (aminoácidos y carbohidratos) y cofactores (vitaminas y oligominerales) y el ambiente local de la herida (aporte vascular y ausencia de infección). Los glucosaminoglucanos son componentes esenciales del tejido de granulación, los principales que se encuentran en heridas son el dermatan y el sulfato de condroitina.

Estos son sintetizados por fibroblastos y luego son sulfatados para dar lugar a los proteoglucanos, su concentración aumenta mucho durante las tres primeras semanas de la cicatrización. Se cree que el ensamble de subunidades de colágeno en fibrillas y fibras depende del enrejado que los proteoglucanos sulfatados proporcionados. Conforme se deposita el colágeno en la cicatriz los proteoglucanos se

incorporan en la estructura del colágeno pero su contenido disminuye gradualmente con la maduración de la cicatriz y remodelación del colágeno.

La maduración y remodelación de la cicatriz inician durante la fase fibroplástica y se caracterizan por una reorganización del colágeno sintetizado con anterioridad. La catálisis del colágeno se lleva a cabo por medio de metaloproteinas de matriz (MPM) al final llegando a una cicatriz rica en colágeno hasta cierto punto acelular.

La fibronectina y el colágeno tipo III constituyen la estructura temprana de la matriz, los glucosaminoglucanos y proteoglucanos representan los siguientes componentes importantes de la matriz y colágeno tipo I es la matriz final. Después de varias semanas se llega a una meseta en la cantidad de colágeno contenido en las heridas pero la fuerza tensional continua durante varios meses.

Tipo molecular	Células que las sintetizan	Función	Localización en el cuerpo
I	Fibroblastos, Osteoblastos, Odontoblastos, Cementoblastos.	Resiste la tensión	Dermis , tendón, ligamentos, capsulas de órganos, huesos, dentina, cemento.
II	Condroblastos.	Resiste la presión	Cartílago hialino, cartílago elástico.
III	Fibroblastos, célula reticular, célula de musculo liso, hepatocitos	Forma marco estructural de bazo, hígado, ganglios linfáticos, musculo liso, tejido adiposo.	Sistema linfático, bazo, hígado, sistema cardiovascular, pulmón y piel .
IV	Células epiteliates, células musculares, células de Schwann	Forma la malla de la lamina densa de la lamina basal para proporcionar soporte y filtración	Lamina basal.
V	Fibroblastos, células mesenquimatosas	Se relaciona con colágena tipo I y también con sustancia fundamental de la placenta	Dermis , tendón, ligamentos, capsulas de órganos, hueso, cemento, placenta.
VI	Células epidérmicas	Forma fibrillas de anclaje que fijan la lamina densa de la lamina reticular subyacente	Unión de epidermis y dermis.

Tabla 3 Clasificación del Colágeno₍₂₂₎

5.3.5 REEPITELIZACIÓN

Los queratinocitos (7° a 9° días) migran desde los bordes de la herida o desde los anexos remanentes con el fin de restablecer la barrera cutánea. La migración se produce gracias a un cambio en su fenotipo que consiste en: a) pérdida del aparato de adhesión (retracción de los monofilamentos y disolución de los desmosomas) b) adquisición de aparato motor (desarrollo de filamentos de actina y la proyección de lamelopodios hacia la herida) y c) la expresión de queratina K6 y K16, marcadores del estado activo. Este proceso lleva a la pérdida de unión entre las células epidérmicas entre sí, a la membrana basal y a la dermis subyacente.

El ciclo de activación del queratinocitos comienza con la IL-1, que lo transforma en célula hiperproliferativa y migratoria. Al llegar a la herida se producirá la migración sobre un sustrato de matriz provisoria rica en fibronectina, mediada por receptores de superficie integrínicos ($\alpha 5$ - $\beta 1$) y la liberación de TGF β . Luego la migración será sobre la matriz definitiva rica en colágeno, mediada por receptores de superficie colagénicos ($\alpha 2$ - $\beta 1$) y la liberación de TGF α /EGF. En la membrana basal desaparecen la laminina y el colágeno de tipo IV.

Cabe destacar que en la piel sana, los queratinocitos no están en contacto con los colágenos de la membrana basal (IV y VII) o de la dermis (I, III y V) que son activadores de la migración y sí lo están con la laminina de la lámina lúcida, la cual inhibe la migración de éstos. La proliferación ocurrirá en forma superpuesta a la migración, mientras las células epiteliales continúan su viaje a través de la herida, las células proximales a éstas proliferan activamente debido a la liberación de mediadores solubles (EGF / TGF α , PDGF / FGF, etc.) y al “efecto borde” (ausencia de células vecinas en aposición que dispararía el estímulo proliferativo en los márgenes de la herida).

Para que el queratinocito sepa cuando finalizar su proceso de migración y proliferación existen varias señales: el INF γ producido por las células inflamatorias lo estimula a expresar queratina K17, que lo convierte en contráctil y facilita la reorganización de la matriz de la membrana basal provisoria y el TGF β estimula la producción de queratinas K5 y K14 que lo convierten en una célula basal para iniciar nuevamente la diferenciación. La reparación de la membrana basal con el nuevo depósito de laminina, es una señal para el queratinocito que indica que la herida ya está reparada y no hay necesidad de migrar. (20)

5.3.6 REMODELACIÓN

Debido a que ha disminuido la cantidad de macrófagos desde el inicio de la herida, en éste momento los fibroblastos inician a producir bFGF, TGF- β , y PDGF. Así mismo producen KGF e IGF-1. Las células dominantes son los Fibroblastos alcanzando un número pico desde 7 a 14 días. Después de la secreción de moléculas de colágeno, los fibroblastos ensamblan la matriz extracelular con fibras de colágeno; éstas fibras son entrecruzadas y organizado en paquetes.

El colágeno es el componente mayor del tejido conectivo en una herida aguda, el total de la producción continúa por las siguientes seis semanas. El incremento del contenido de colágeno en la herida se correlaciona con el incremento de la fuerza de tensión, lo cual es el parámetro más importante en la cicatrización de la herida, seguido por la reepitelización y remodelación de la herida. (20)

5.4 PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El Plasma Rico en Plaquetas es un preparado autólogo de suero con alta concentración de plaquetas y proteínas como la fibrina y fibronectina, capaces de aumentar la adhesión celular y conforman una matriz para la formación de hueso, tejido conectivo y epitelio. (24)

El plasma rico en plaquetas (PRP) ha demostrado acelerar la cicatrización de los tejidos blandos y la formación de hueso. El contenido elevado de plaquetas contenedoras de factores de crecimiento en el PRP

muestran sus efectos terapéuticos al ser administrados posterior a la injuria liberando durante la primera hora hasta un 95% de los factores de crecimiento contenidos; hecho que cataliza el proceso de regeneración, para que en los próximos 7 días ocurra una paulatina liberación de dichos factores como soporte y sustrato de la cicatrización. ⁽²⁵⁾

No existe una cifra ideal establecida de la concentración de plaquetas que deba contener el PRP, sin embargo se ha visto que concentraciones de 300-400% con respecto al conteo de plaquetas tiene mejor efectividad terapéutica, sin suponer mejor actividad en plasma más o menos concentrado. ⁽²⁶⁾

Se ha demostrado que su aplicación disminuye el sangrado, el dolor y las infecciones, factor de relevancia clínica en las quemaduras y determinante en la mejoría en la adhesión a tejidos a largo plazo. ⁽²⁷⁾

Sin embargo, no todos los estudios realizados nos llevan a un resultado positivo, en gran parte es por la falta de estandarización de su obtención y los diferentes concentrados, como puede ser la plaquetoféresis realizado únicamente en ambientes hospitalarios, centrifuga simple o doble. De las cuales pueden resultar plaquetas con cambios morfológicos, daños o lisis que pueden llevar a una liberación prematura de los factores de crecimiento. ⁽²⁶⁾

5.4.1 COMPONENTES DEL PRP

Los componentes del PRP son tres grandes grupos: plaquetas, leucocitos y los factores de crecimiento, los cuales ejercen la función de regeneración.

PLAQUETAS

Son fragmentos citoplasmáticos que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos de la médula ósea de aproximadamente 3 mm² de diámetro, 4 – 7 mm³ de volumen y 10 pg de peso. Están adaptadas para adherirse a vasos sanguíneos, agregarse entre sí y formar trombina.

Su concentración normal en la sangre es de 150 a 350 x 10⁶/mL y su tiempo de vida media en sangre es de 7 a 10 días. Junto a los eritrocitos y leucocitos constituyen los elementos formes de la sangre.

Su membrana extracelular funciona como receptor de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, TXA₂, trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand [vWF]) y para ligandos fibrosos como el colágeno, además, posee enzimas importantes para el funcionamiento celular y fosfolípidos.

Su fuente de energía es la glucosa que es obtenida partir del glucógeno a través de la glucólisis anaeróbica. ⁽²³⁾

La función principal de las plaquetas es sellar las aperturas vasculares. Señal que inicia y activa las plaquetas al presentarse una injuria un vaso sanguíneo. Manteniéndose separadas las plaquetas circulantes mientras exista un revestimiento endotelial intacto. Otros parámetros que probablemente controlan la respuesta plaquetaria son:

- 1) Profundidad de la lesión
- 2) Lecho vascular
- 3) Edad del individuo
- 4) Número de glóbulos rojos; a mayor numero, mayor concentración.
- 5) Velocidad del flujo sanguíneo y tamaño del vaso.

La respuesta de vasoconstricción que acompaña a una lesión vascular probablemente contribuye a que las plaquetas, mediante la liberación de tromboxano A2 y serotonina, tengan un papel clave en la disminución de la hemorragia.

La velocidad del flujo afecta directamente a la adhesión en su superficie; ésta respuesta, dependiente del factor von Willebrand, es más importante con velocidades de flujo mayores, probablemente debido a que éstas producen cambios de conformación en el factor von Willebrand y/o en el GPIb. Una velocidad de flujo muy alta puede determinar que las plaquetas se agreguen a través de un mecanismo que implica una unión de factor von Willebrand a la GPIb/IX seguido de la activación de la GPIIb/IIIa.

Varios factores inhibidores sirven para equilibrar la activación plaquetaria y prevenir el depósito excesivo de plaquetas. Entre estos inhibidores están la prostaciclina y el óxido nítrico que son sintetizados por las células endoteliales. (3)

Con la activación experimentan la liberación de los gránulos, cuerpos densos y del contenido de los lisosomas. El aumento de calcio intracelular es el resultado de la activación plaquetaria y retroalimenta a la misma. Lo que provoca un cambio en la conformación del receptor GPIIb/IIIa que lleva a la unión de un ligando de alta afinidad y a la agregación plaquetaria. (3)

Las plaquetas también actúan como almacenes de las moléculas que influyen en funciones plaquetarias, inflamación, tono vascular, fibrinólisis y cicatrización de las heridas. (3)

La participación plaquetaria en la hemostasia y trombosis depende de la ocurrencia de 3 eventos:

- Enlace plaqueta -superficie o adhesión plaquetaria.
 - El cambio de forma.
 - El enlace plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria.(23)
- **Adhesión plaquetaria:** las plaquetas tienen la capacidad de adherirse a superficies sobre las que se expanden y se ligan al fibrinógeno, a través de su unión a GPIIb/IIIa. También se adhieren al colágeno (fundamentalmente de los tipos I y III), vWF, fibronectina, laminina. En condiciones de bajo flujo sanguíneo, éste evento es mediado por la interacción vWF-GPIb, pero en condiciones de alto flujo también se requiere la participación de GPIIb/IIIa. Se forman enlaces firmes que dependen de la estructura fibrilar del colágeno y de la cantidad de subunidades RGD. La adhesión plaquetaria al colágeno requiere de la interacción del colágeno con vWF del plasma, GPIb, GPIaIIa de la membrana plaquetaria que durante la formación del coágulo establecen enlaces plaqueta-fibrina. Se produce la internalización de las mallas de fibrina o de colágeno, que son rodeados de microfilamentos.(3) (23)
 - **Cambio de forma:** ésta es la primera manifestación física de la activación plaquetaria su cambio de discocito a esferocito, que se acompaña de un incremento en la superficie desde 8,02 mm² a 13,0 mm² Disminuye la longitud del subesqueleto submembrana cuya evaginación aporta membranas para éste proceso. Se produce la redistribución de los microtúbulos, que están en estrecho contacto con el gel contráctil y se trasladan hacia el centro de la célula.(23)
Se procede a la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa. Es un proceso independiente de calcio (cuando el estímulo es el ADP) y dependiente de energía.(23)
 - **Agregación plaquetaria:** Estímulos fisiológicos para la activación plaquetaria son la trombina, el colágeno, el ADP, la epinefrina, el tromboxano A2 (TXA2).

Después de la activación hay incremento de la concentración de calcio citoplasmático, cuyo mecanismo bioquímico no es conocido totalmente. Con respecto a la trombina, el colágeno y el TXA₂, se ha demostrado la ocurrencia de activación de la fosfolipasa C, que da lugar a la formación de 1, 4,5 trifosfato de inositol (que libera calcio del sistema tubular denso y activa una miosina kinasa) y 1,2 diacilglicerol (activa la proteína kinasa C, que desencadena fosforilaciones de proteínas importantes para el proceso de agregación plaquetaria).

Se desconocen los mecanismos bioquímicos que llevan a la activación de la GPIIb/IIIa y el enlace del fibrinógeno, pero hay evidencias de que éste último es independiente del calcio.

La activación plaquetaria por agentes como trombina, colágeno, ADP y epinefrina, puede conducir a la activación de la fosfolipasa A₂ citoplasmática, que requiere concentraciones fisiológicas de calcio para activarse, la cual cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y da lugar al ácido araquidónico que se metaboliza preferencialmente por la vía de la TXA₂ sintetasa para dar lugar al TXA₂, producto inestable (sólo 5 s dura su actividad). De esta manera el TXA₂ constituye un amplificador de la señal de activación plaquetaria. Después de un estímulo fuerte los gránulos alfa y densos se alargan y emiten pseudópodos, se aproximan a la membrana plasmática y se funden con ella, aumentan de volumen debido a la entrada de agua y esto propicia la liberación de su contenido al medio exterior, lo que se denomina secreción.

El ADP produce una primera fase de agregación reversible, de aproximadamente 30 s de duración, por activación del receptor, a lo que sigue una segunda fase irreversible y que depende de la síntesis de TXA₂. El TXA₂ parece requerir de la liberación de ADP.⁽²³⁾

REGULACIÓN DE LA ADHESIÓN Y AGREGACION PLAQUETARIA

Las plaquetas circulantes se encuentran en una interacción dinámica con los componentes del plasma, los demás elementos formes de la sangre y con el endotelio vascular a través de las glicoproteínas de las membranas plaquetarias y de diferentes mediadores químicos.

Los eritrocitos, que viajan por la parte central de la corriente sanguínea, desplazan a las plaquetas hacia las cercanías de la pared del vaso. La adhesión plaquetaria sólo será efectiva cuando se produzcan enlaces irreversibles. La célula endotelial libera mediadores químicos que impiden que ocurra la adhesión plaquetaria a un endotelio sano. Estos mediadores son la prostaciclina (PGI₂), principal metabolito del ácido araquidónico en la célula endotelial, y el óxido nítrico (NO), producto del metabolismo de los aminoácidos. La PGI₂ estimula la adenilciclasa en la plaqueta y aumenta los niveles intracelulares de AMPc, mientras el NO estimula la síntesis de GMPc, que es el más potente inhibidor de la hidrólisis del AMPc. Ambos inhiben la adhesión plaquetaria y además, estimulan la reducción del calcio libre intracelular así modulan la agregación plaquetaria.

Entre los mecanismos que favorecen la adhesión/agregación están la liberación de ADP de los eritrocitos, que se lisan; la liberación del factor activante de plaquetas (potente estimulante de la agregación plaquetaria cuya función fisiológica en el humano no se ha determinado) y TXA₂ de los leucocitos activados, la exposición de P selectina en las membranas de células endoteliales y plaquetas, que media la interacción intercelular a través del reconocimiento de estructuras hidrocarbonadas ricas en ácido siálico. Otro elemento influyente es el “shear stress” del flujo sanguíneo, que induce agregación plaquetaria a través del enlace del vWF con la GPIb y con una fuerte participación del ADP liberado.

El estímulo para la participación de las plaquetas en los procesos de hemostasis y trombosis es la lesión del endotelio vascular, considerado como tal el daño físico con exposición de la membrana basal rica en colágeno o la disfunción endotelial con desbalance de la producción de mediadores anti y proagregantes.

Cuando las plaquetas se adhieren al endotelio atraen más plaquetas P selectina positivas. Se reclutan y activan a los leucocitos, los cuales se unen irreversiblemente a la superficie plaquetaria por medio de la molécula de adhesión ICAM-2. La activación del receptor para el fibrinógeno soluble y la participación de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria como cofactores para la cascada de reacciones enzimáticas de la coagulación favorecen la formación del trombo arterial.

Por otra parte algunos componentes de los gránulos plaquetarios, que se liberan durante la activación, influyen sobre otras células, uno de ellos es el factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF), que estimula la proliferación celular y juega un papel importante en la cicatrización de heridas y al parecer también en el proceso de aterogénesis: el TXA₂ y la 5HT, que son potentes vasoconstrictores y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que tiene acción antifibrinolítica.⁽²³⁾

PDGF (Factor de crecimiento plaquetario):

El factor de crecimiento puede encontrarse en macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos y en la matriz ósea.⁽³⁾

Tiene un papel muy importante en el desarrollo embrionario, promueve en la reparación de tejidos a través de la quimiotaxis, es activador de macrófagos, estimula la angiogénesis indirectamente, la migración epitelial, junto con la migración de neutrófilos, proliferación de fibroblastos y por lo tanto la formación de colágeno tipo I. ^{(3) (28) (26)}

TGF-BETA (Factor de crecimiento de transformación beta):

Pertenece a la familia de proteínas morfogenéticas. Se describen tres tipos: el beta 1 que se encuentra en las plaquetas, el beta 2 puede encontrarse en extractos óseos y el beta 3 o 1.2 que son heterodímeros.

Entre sus funciones podemos mencionar:

- Inhibición de la síntesis de esteroides adrenales.
- Transformación fenotípica de fibroblastos.
- Regulación de la embriogénesis y de la diferenciación.
- Inhibición de la proliferación de células mesenquimales, epiteliales y endoteliales.
- Estimulación de la proliferación de células mesenquimales y endoteliales.
- Control de las interacciones de la matriz extracelular.
- Inmunosupresión.
- Control de la acción y biosíntesis de la hormona folículo estimulante.⁽³⁾

Pasan de su forma latente a su forma activada por mediadores tales como el óxido nítrico, plasmina, trombina e integrinas. ^{(26) (28)}

Se debe tomar en cuenta que puede tener participación en la invasión y metástasis durante un crecimiento tumoral.

Además disminuye la actividad de las proteasas de la matriz extracelular y aumenta las actividades inhibitoras de proteasas, lo que resulta en una disminución de la degradación del colágeno. Por todo ello, TGF- β está implicado en el desarrollo de fibrosis en varios procesos de inflamación crónica, sobre todo en los pulmones, los riñones y el hígado.

FGF (Factor de crecimiento fibroblástico):

Son secretados por las plaquetas y queratinocitos, constituyen una amplia familia de polipéptidos con siete isoformas de las cuales el FGF 1 es el más estudiado en la reparación de tejidos.⁽²⁶⁾

Estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, inhiben los osteoclastos.

Además trabajan sobre la proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos. Tienen un fuerte papel en la angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.⁽⁶⁾

Varios tipos de FGF participan en la diferenciación del músculo esquelético y cardíaco, en la maduración de los pulmones y en la especificación de los hepatocitos a partir de las células del endodermo.

IGF (Factor de crecimiento similar a la insulina):

Se llama así por su gran similitud en composición con la insulina y se han descrito dos tipos similares, con diferencias estructurales y funcionales, denominados IGFs (de sus siglas en inglés *insulin growth factors*):

- El factor de crecimiento de tipo insulina tipo I o IGF-I (somatomedina C).
- El factor de crecimiento de tipo insulina tipo II o IGF-II.

Su reservorio es principalmente el plasma y son transportados por 6 ligandos proteicos (IGFBPs) que modulan sus acciones biológicas. Se conocen por ser péptidos de fuerte acción anabólica. Entre sus funciones se pueden destacar:

- Estimular la síntesis de la matriz ósea, diferenciando a los osteoblastos y replicando células osteoprogenitoras.
- Es mitogénica y quimiotáctica de células.
- Es estimuladora del glucógeno hepático.
- Presenta una gran sinergia con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular):

El factor de crecimiento endotelial vascular es una proteína con similitud en un 24% al factor de crecimiento derivado de las plaquetas pero se une a otros receptores.⁽³⁾

Está implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis. In vitro, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. También es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular. ⁽²⁶⁾

EGF (Factor de crecimiento epidérmico):

Factor de crecimiento epitelial consiste en una cadena simple de polipéptidos, tanto EGF como TGF-alfa utilizan el mismo receptor (EGFR) que activa los procesos de reparación de tejidos, por medio de los macrófagos, los queratinocitos y otras células inflamatorias que migran a la zona dañada segregan EGF, que se distribuye ampliamente en secreciones tisulares y fluidos. Se expresa grandemente en los márgenes de heridas promoviendo la reepitelización, regulando la expresión del colágeno I y la migración celular a través de él. ^{(26) (28)}

5.4.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El Plasma rico en factores de crecimiento PRF representa un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como terapéutica. Supondría el uso de un concentrado plaquetario en el que la concentración y determinación de los factores de crecimiento es conocida de antemano y pasaría a denominarse como concentrado en factores de crecimiento. Los datos clínicos nos revelan que el uso de PRF actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la cicatrización sin procesos inflamatorios excesivos generando la liberación de estos factores, que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular. ⁽²⁹⁾

Desde la implementación del PRP en diversos campos de la medicina, se han diseñado una variedad de métodos por los cuales se obtienen diferentes concentraciones de plaquetas. ⁽²⁰⁾

Dentro de los sistemas para la obtención de un concentrado en plaquetas se podría hacer una clasificación atendiendo a la cantidad de sangre necesaria para este fin⁽³⁾

Un primer grupo de métodos comprende aquellos que utilizan una gran cantidad de sangre, aproximadamente 500 ml.

Estos métodos se denominan sistemas de aféresis y son sistemas de ámbito única y exclusivamente hospitalario. El sistema consiste en la obtención de una vía venosa del paciente a través de la cual se hace pasar la sangre a una centrífuga que por gradiente separa los elementos celulares; posteriormente se reinfunde al paciente tanto el plasma como las células que no se van a utilizar, todo ello en un sistema cerrado y estéril que evita la contaminación. Con este sistema se puede obtener una gran concentración de plaquetas que, además, suele ir acompañada de la serie leucocitaria. La mayoría de los trabajos consultados sobre este sistema intentan buscar una forma de prevenir la acumulación de citoquinas y leucocitos en el concentrado plaquetario.

Un requisito importante en estos sistemas para obtener concentrado de plaquetas es la conservación de las mismas de forma íntegra pero sin que se activen. Para evitar que la sangre se coagule suelen utilizarse sustancias como el citrato sódico; el EDTA (ácido etilendiamida tetracético) su uso no se recomienda debido a que tiende a fragmentar las plaquetas. También se han observado los cambios plaquetarios durante su almacenamiento; cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento mayor es la probabilidad de que se produzca fragmentación. A las pocas horas de la extracción de sangre se libera el contenido de sus gránulos alfa, lo que hace aconsejable su rápida utilización.

En el segundo gran grupo de métodos de obtención de plasma con plaquetas se utilizan una cantidad de sangre menor y además el sobrante no es reinfundido al paciente. La cantidad que suelen manejar estos sistemas es de 50 a 200 ml, que se obtienen normalmente tras la venopunción de la flexura del codo; con la ayuda de anticoagulantes se colocan en un recipiente para su centrifugación. El anticoagulante que suele utilizarse suele ser citrato sódico o citrato dextrosa en una proporción de seis ml. por cada 60 ml. de sangre. De este tipo de sistemas se podrían señalar fundamentalmente tres modelos:

Vivostat PRF preparation Kit®.

PCCS plateler concentrate collection system®.

Haverst® Smartprep 2APC 60 Process.⁽³⁾

Vivostat PRF preparation Kit®.

Es un sistema desarrollado por la compañía BIOSER.

Con 120 ml. de sangre del paciente se obtienen 6 ml. de fibrina autóloga más factores de crecimiento. Es un sistema completamente automático en el que se extrae la sangre al paciente anticoagulada con citrato sódico y se deposita en el contenedor específico de la máquina, que a su vez se pone en el interior de la unidad de procesamiento, donde se centrifuga para obtener el concentrado de factores de crecimiento y fibrina, que se pueden dispensar mediante un aplicador especialmente diseñado para su utilización en forma de spray.

PCCS plateler concentrate collection system®.

Desarrollado por Biomet 3i implant innovation, la extracción de sangre se realiza mediante la venopunción con una jeringa de 60 ml previamente tratada con ADO. Posteriormente se coloca en la bolsa colectora que proporciona el fabricante.



Ilustración 5 Sistema de concentración de plaquetas⁽³⁾

La muestra se introduce en la centrifugadora y se contrapesa con agua utilizando la misma cantidad de agua que de sangre. Se cierran las válvulas del contenedor y se realiza un primer centrifugado durante 3 minutos y 45 segundos a una velocidad de 3000 revoluciones por minuto. Una vez terminado se realiza la primera manipulación del centrifugado resultante, primero mediante la infusión de aire en la cámara del contenedor que contiene la sangre se separan el plasma y los glóbulos rojos colocando una jeringa en una de las válvulas de la bolsa y abriendo la válvula que comunica con la cámara adyacente que conforma el recipiente colector.

Al insuflar el aire se separa el plasma en el otro recipiente, se cierran las válvulas y se vuelven a colocar en la centrifuga para realizar esta vez un centrifugado durante 13 minutos. Pasado ese tiempo se vuelve a hacer otra separación en las bolsas del recipiente. De nuevo se introducen mediante la ayuda de una jeringa 35 centímetros cúbicos de aire para separar el plasma pobre en plaquetas. El resultado obtenido es de 5 a 7 ml. de concentrado en plaquetas que se podrán extraer con la ayuda de una jeringa para su posterior utilización.

Haverst® Smartprep 2APC 60 Process (Ahora Symphony-II).

Comercializado por la casa Johnson and Johnson, en este sistema se utilizan también entre 50 y 60 ml. de sangre del paciente previamente anticuagulada con citrato sódico. El recipiente diseñado por la marca contiene dos departamentos, introduciendo la sangre en el más grande de ellos; colocaremos dicho recipiente en la centrífuga y se contrapesará con agua para realizar la centrifugación durante 14 minutos.



Ilustración 6 Sistema de Recolección de Plaquetas Symphony:⁽³⁾

El tercer gran grupo de sistemas de obtención de plasma con plaquetas son aquéllos que utilizan una cantidad inferior a 50 centímetros cúbicos.

1. El sistema PRGF System II. BTI®.
2. Curasan system®.
3. Sistema descrito por Dr Sonnleitner.
4. Sistema del Dr. Gonsord.
5. Fibrinet® Autologus Fibrin et platelet System.
6. Plateltex®.
7. Friadent-Schützer®.
8. PDGF 90-1.
9. Plaquetar®⁽³⁾

Cada uno de estos sistemas presentan mecanismos de obtención de plasma rico en plaquetas similares, utilizando jeringas sistematizadas y tubos conteniendo diversos reactivos ya preparados para su utilización, con requerimientos de sangre entre 5-50ml dependiendo de las necesidades clínicas. Se realiza la extracción mediante venopunción en tubos estériles de 5 cc o 10cc utilizando un anticoagulante como citrato sódico, posteriormente se procese al primer centrifugado con un tiempo y velocidad de revoluciones estipuladas para obtener dos fases que consisten en los elementos pesados, es decir glóbulos rojos y el suero. A continuación el suero resultante se somete a una segunda centrifugación a mayor tiempo y mayor velocidad obteniendo nuevamente dos fases, un suero pobre en plaquetas y uno rico en plaquetas, en esta etapa con ayuda de pipetas se irán extrayendo la fase superior hasta llegar a la última fracción que es la que mayor concentración de plaquetas obtiene. Para activar el coágulo se utiliza cloruro cálcico al 10% en una proporción de 50µl. por cada 1000 µl. de suero⁽³⁾

. Some methods used for preparing platelet concentrates in human medicine. Comparison of some cellular and molecular aspects

Method	Platelets x10 ⁹ /µl	Leukocytes x10 ³ /µl	TGF-β ₁ (ng/ml)	PDGF-AB (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	Reference
Apheresis	270-1408	0.1-17.4	221	117.5-125	84.2	50, 57
Tube	513.6	6.5	73.3	47	78	48
PCCS®	1073-2209	14.15	289.5	156.7	78	50,
GPS®	1601	ND	120	ND	ND	56
Curasan Kit®	1075-2519	14.8	499.8	295.2	ND	50, 52
Smart PRP™	1227	19.2	77.2	208.3	72.8	53
Friadent-Schütze PRP Kit®	1440.5	21.6	196.8	251.6	91.4	53

PC: Platelet concentrate; TGF-β: Transforming growth factor beta; PDGF: Platelet derived growth factor; IGF: Insulin-like growth factor.

Otro método conocido como Plaquetas Ricas en Factores de crecimiento el cual se obtiene de una forma sencilla y poco costosa en comparación con otros métodos.⁽²⁶⁾ El PRP es obtenido de la sangre autógena a través de un proceso que utiliza el principio de la separación celular por centrifugación diferencial, en el cual se extrae sangre del donante, se separan las distintas fases y se obtienen aquellas de mayor interés según el caso.⁽²⁰⁾

Esta centrifugación ha sido simplificada para poder usarse tanto en laboratorio como en sala de operaciones, sin embargo el proceso de centrifugación debe ser estéril además debe haber una adecuada colocación del material para lograr la separación de las plaquetas de los eritrocitos sin que exista destrucción o daño sobre las plaquetas logrando así continuar secretando factores de crecimiento.⁽²⁰⁾

Todas las técnicas desarrolladas para obtener un concentrado de plaquetas tanto los Sistemas Automáticos de Aféresis y Métodos semiautomáticos presentan ventajas y desventajas, no existe un método ideal para concentrar plaquetas.⁽²⁶⁾

El anticoagulante utilizado en la mayoría de procesos es citrato sódico, aunque otros autores han visto que la adición de dextrosa mejora la estabilidad de los preparados así como la reducción de volumen para obtener los mismos resultados. La mayoría de procesos de activación del PRP se basan en la adición de trombina exógena, combinada con CaCl₂.

Landesberg ⁽²⁰⁾ demostró que la activación de las plaquetas se ve afectada por muchos procesos como son la liberación de los factores del crecimiento, el tipo de coagulante utilizado, la velocidad de centrifugación y su duración así como la preparación. La utilización de trombina en conjunto con CaCl₂ está cada vez mas recomendado, la falta de trombina en el proceso de preparación del PRP previene la activación prematura de las plaquetas y la degranulación, y observa que la adición de trombina produce la liberación inmediata de citoquinas, para sus estudios propone la utilización de PRFM, matriz de plaquetas ricas en fibrina preparada sin trombina exógena.

El concentrado de factores de crecimiento es un producto inestable y difícil de administrar en numerosas aplicaciones clínicas en igual condiciones, para producir una textura estable se suele utilizar CaCl₂ + trombina exógena para activar las plaquetas y los residuos de fibrina. Un exceso de trombina genera la degranulación irreversible de las plaquetas con la pérdida de integridad de las plaquetas y la consecuente liberación de factores de crecimiento de forma inmediata. ⁽²⁰⁾

Los métodos de obtención de concentrado de plaquetas denominado PRFM sin la adición de trombina consigue la liberación paulatina de factores de crecimiento durante al menos 7 días. ⁽²⁰⁾

5.4.3 APLICACIONES DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

Los usos de plaquetas en la industria humana han sido ampliamente vistos; de hecho la popularidad del uso en otros campos se debe en parte a los resultados positivos obtenidos en odontología.⁽²⁰⁾

En el campo de la Oftalmología existen diferentes trabajos; Ghering en 1999 mediante una aféresis conseguía un concentrado en plaquetas mediante dos centrifugados. Estos concentrados se usaban en pacientes con máculas retinianas en estadio II a IV. El resultado fue que la cicatrización de la mácula se consiguió en 18 de los 19 pacientes tratados y que en 14 de ellos mejoró la agudeza visual, concluyendo que el concentrado de plaquetas era efectivo en el tratamiento de las máculas retinianas.⁽³⁾

Hartwing lo utilizo en la epitelización de defectos de la cornea. Obtenía el concentrado en plaquetas mediante plaquetoféresis y lo usaba como colirio para acelerar la cicatrización de úlceras corneales. El resultado clínico se verificó haciendo un cultivo de células de epitelio humano a las que aplicó el concentrado en plaquetas observando migración y diferenciación celular. Como conclusión se confirmó que el concentrado en plaquetas tenía un efecto positivo sobre la estimulación de las células epiteliales de la córnea.⁽³⁾

Un grupo español ha publicado recientemente la eficacia del tratamiento subconjuntival y tópico de concentrado de plaquetas tras el autotrasplante y heterotrasplante compatible de células de limbo en el ojo con insuficiencia limbar total tras quemaduras por ácido en los que había sido insuficiente un injerto previo. El resultado puso de manifiesto el acortamiento del tiempo de adaptación de los injertos,

estabilización corneal y mejora de la agudeza visual en el ojo tratado. Al mismo tiempo se aceleraba la cicatrización del ojo donante con la aplicación tópica.⁽³⁾

En Cirugía plástica se ha utilizado para mejorar la cicatrización, como describe Eppley, estos estudios se han realizado en modelos animales estudiando la mejora de la cicatrización. Demostraron que un adecuado nivel de concentración de factores de crecimiento favorece la cicatrización de procedimientos quirúrgicos.⁽³⁾

En el campo de la Traumatología ha sido más utilizado; Sánchez utilizó plasma rico en factores de crecimiento según el método de Anitua⁽³⁾ para realizar 50 plastías del ligamento cruzado anterior, frente a otros 50 pacientes de control. El resultado es que en el grupo de estudio aparecieron menos complicaciones postoperatorias como hematomas, infecciones, drenajes de la articulación y síndrome de Cyclops. La cicatrización de las heridas y la integración de la plastía fueron más rápidas también en el grupo de estudio que en el control. Su conclusión fue que los beneficios que aporta el plasma rico en factores de crecimiento son alentadores para cirujanos y pacientes.⁽³⁾

En Dermatología se ha usado para la curación de úlceras de la piel, bien por origen vascular o diabético, traumatismos y quemaduras. Anitua presenta una serie de casos en los que consigue la curación de este tipo de úlceras en pacientes con estos problemas.⁽³⁾

Se ha reportado que su uso disminuye el tiempo operatorio, elimina la necesidad de drenajes y vendajes compresivos y disminuye la incidencia de complicaciones, y disminuye el tiempo de hospitalización. Cirujanos plásticos han observado que el PRP posee propiedades antiinflamatorias, bactericidas, regenerativa y propiedades hemostáticas.⁽²⁰⁾

Uno de los campos en los que los autores muestran un mayor acuerdo es en la mejora de la cicatrización de tejidos blandos. Con esta intención se ha utilizado en la maduración de los tejidos en la cirugía estética periodontal. De esta forma se ha visto que disminuyen los problemas postoperatorios en la cirugía y aumenta el nivel de recubrimiento radicular.

Además, la utilización de la parte pobre de plaquetas resultante de la centrifugación en la zona donante de tejido disminuye el sangrado del paladar por la actividad coagulante de la fibrina existente. Este dato se ha demostrado en un estudio en el que se analizaba la influencia de los diferentes factores de crecimiento existentes en el PRP sobre los fibroblastos y la angiogénesis, mediante análisis del RNA e inmunohistoquímica.

En el intento de hacer llegar los métodos de obtención de concentrado en plaquetas al ámbito extrahospitalario, Eduardo Anitua en 1999 describió su propio método así como los resultados preliminares para la preparación de lechos óseos para la posterior colocación de implantes. En dicho trabajo describe como con una pequeña cantidad de sangre, de unos 10 ml, pueden obtenerse entre 1 y 2 ml. de concentrado en factores de crecimiento (PRGF). Posteriormente ha realizado diferentes publicaciones en distintas revistas en la que cambia el protocolo inicial de 160g por 280g o 460g, realizando también experimentación animal y viendo la capacidad de regeneración en defectos creados artificialmente que luego biopsia, con unos resultados sorprendentes.⁽³⁾

5.4.4 EFECTOS ADVERSOS DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS

Beca T et al en el año 2007 niegan la existencia de algún efecto indeseable como riesgo de infecciones o transmisión de enfermedades, sin embargo, se ha relacionado la sobreexpresión de factores de

crecimiento y sus receptores con tejidos tumorales y displásicos, lo cual hace pensar en dos posibles riesgos: la carcinogénesis y la posibilidad de favorecer la metástasis.

En cuanto a carcinogénesis la evidencia científica muestra de forma experimental que los factores de crecimiento encontrados en las plaquetas aparecen sobre expresados en los tejidos tumorales, esto no como consecuencia de una sobreproducción de los mismos, si no debido a alteraciones de genes codificadores de receptores de factores de crecimiento que provocan un incremento del número de estos receptores, así por ejemplo en células tumorales se han observado unos 400.000 receptores normales de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), en contraposición a fibroblastos normales que pueden presentar de 5.000 a 10.000. En las células tumorales la presencia de un número excesivamente alto de copias de EGFR provocaría un aumento de la sensibilidad a sus ligandos que, incluso a concentraciones muy bajas, serían capaces de estimular las células e inducir proliferación celular.

Cuando la señal de los factores de crecimiento llega al núcleo, se activarían una serie de factores que facilitan la transcripción de diferentes genes implicados en el ciclo celular o en la diferenciación fenotípica de la célula. Por ejemplo los protooncogenes c-jun y c-fos son inducidos rápida y transitoriamente tras el tratamiento con GFs, y son los genes de estas dos familias los que controlan la respuesta proliferativa de un modo primario. Con estos datos se podría concluir el potencial carcinogénico del PRP y, sin embargo, tras la extensa experiencia científica, no existe ningún caso descrito de lo anterior.

En cuanto al potencial de provocar metástasis se sabe que las plaquetas recubren las células tumorales, facilitando su supervivencia y adhesión a las paredes vasculares, y por otro lado favorecen su permeabilidad vascular, lo que permite la penetración tumoral en el tejido perivascular, mediado principalmente por el VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor). Parece además que las células tumorales facilitan la agregación plaquetaria liberando el VEGF de las plaquetas que necesitan para su invasión tisular. Este fenómeno es necesario tenerlo en cuenta en el caso de que se aplicara el PRP en las vecindades de un tumor con capacidad de metastásis, pero en la mayoría de los casos, no nos vamos a encontrar con esta incidencia, sobre todo si hacemos un correcto diagnóstico de este tipo de lesiones.

La transmisión de patógenos es otro probable efecto adverso, cuyo origen podría establecerse debido a contaminación del producto durante o después de su obtención, lo cual no debería de ocurrir si se guardan las normas de esterilidad tanto durante la extracción de la sangre como en la preparación del PRP.⁽²⁸⁾

VI. METODOLOGÍA

6.1 Hipótesis:

Dadas las propiedades del PRP y de las acciones conocidas de los factores de crecimiento en la regeneración tisular, la inyección intralesional de quemaduras de Segundo grado con PRP beneficia la cicatrización y recuperación del tejido en un modelo animal de quemaduras térmicas.

6.2 Tipo de estudio:

Diseño experimental, que analizó el efecto proliferativo del PRP en un modelo animal de quemaduras térmicas de segundo grado.

6.3 Población universal y muestra:

La población total estuvo compuesta por una población de conejos Neozelandeses machos con un peso de 3.5kg +/- 0.5kg los cuales fueron escogidos y repartidos aleatoriamente en tres grupos de cuatro conejos cada uno. En el primer grupo (A) se incluyó los manejados con Sulfadiazina de plata 1%, el segundo grupo (B) fueron tratados con PRP intradérmico y grupo (C) con curaciones diarias con agua estéril y jabón clorhexidina₍₃₀₎.

6.3.1 Criterios de inclusión:

- a. Conejos machos raza Nueva Zelanda
- b. Conejos en buen estado de salud

6.3.2 Criterios de exclusión:

- c. Conejos con procesos patológicos
- d. Conejos que presentaron un proceso de infección asociada a la quemadura realizada en las primeras 24 hrs.
- e. Conejos que fallecieron durante el experimento.

6.3.3 Tipo de muestreo:

La muestra estuvo conformada por 12 conejos aleatorizados en 3 grupos (A), (B) y (C) Cada conejo se identificó con una escala numérica de 1 a 4 precedida de la letra que identifica a su grupo. Para reconocer a los sujetos se utilizaron collarines con su etiqueta correspondiente, en cada conejo se realizaron 4 quemaduras las cuales se numeraron del 1 al 4 en dirección de las agujas del reloj.

6.4 Operacionalización de variables:

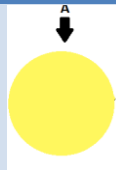
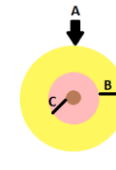
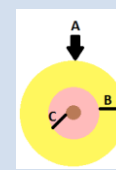
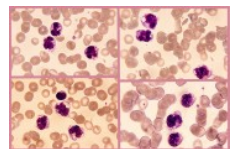
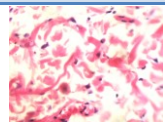
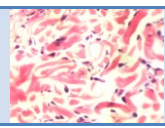
Cuantitativas	Definición	Unidad de medida	
Área inicial de las quemaduras	Medida del área de cada quemadura posterior a su realización en el día cero	Milímetros	 <div> A= área Inicial de la quemadura B=Brecha de Tejido de Granulación C=Brecha lesion persistente </div>
Brecha de lesión persistente 3, 12 y 15	Se obtiene midiendo área de tejido no cicatrizado.	Milímetros	 <div> A= área Inicial de la quemadura B=Brecha de Tejido de Granulación C=Brecha lesion persistente </div>
Tejido de granulación formado día 3, 12 y 15	Se obtiene restando el área inicial de quemadura menos el tejido no cicatrizado del día 3, 12 y 15.	Milímetros	 <div> A= área Inicial de la quemadura B=Brecha de Tejido de Granulación C=Brecha lesion persistente </div>
Concentración de plaquetas inicial.	Recuento plaquetario estandarizado	(plq/mm3)	
Concentración PRP.	Conteo de PRP sobre conteo de plaquetas de sangre completa multiplicado por cien para obtener un porcentaje.	Por ciento (%)	$\frac{\text{Conteo plaquetas PRP}}{\text{Conteo plaquetas sangre}} \times 100$
Aumento de la concentración % de plaquetas en relación a sangre completa.	Conteo de plaquetas de PRP menos el conteo de plaquetas de sangre completa sobre el conteo de plaquetas de sangre multiplicado por cien.	Porcentaje total del aumento.	$\frac{\text{Plaquetas PRP} - \text{conteo}}{\text{Conteo plaquetas sangre}} \times 100$
Angiogénesis	Presencia o ausencia de nuevos vasos sanguíneos	Vasos presentes	
Inflamación	Hallazgo microscópico presente o ausente.	Corte Histológico	
Características del colágeno	Espesor y laxitud del colágeno observado al microscopio de luz.	Corte Histológico	

Tabla 4 Operacionalización de Variables.

6.5 METODOS Y TÉCNICA:

6.5.1 Preparación de los animales:

Cada unidad experimental reposo en un habitáculo de 48cm x 60cm x 50cm en donde se adapto por un lapso de cinco días, a condiciones ambientales de temperatura entre 18 y 23 grados centígrados y ciclos de luz-oscuridad de 12/12hrs con alimentación y agua add libitum; veinticuatro horas previo a la realización de la injuria térmica se procedió a preparar el área recortando el vello de la superficie dorsal con una tijera, y depilación de la zona donde se realizo las quemaduras mediante la aplicación de crema depilatoria.

El día de la intervención cada unidad experimental estuvo sometida a un ayuno previo de 6hrs, fue pesada, para la estimación de superficie corporal y dosis para la inducción y mantenimiento anestésico mediante la aplicación intramuscular de ketamina 25mg/kg y xilacina 5mg/kg.⁽³¹⁾

Una vez fue verificado el estado anestésico mediante la comprobación de reflejos de la cabeza erguida y de estación⁽³²⁾ se procedió a la asepsia y antisepsia mediante la aplicación local de clorhexidina solución al 2% y agua estéril en la región de la arteria marginal de la oreja y tórax posterior de cada unidad.

Previo a la realización del procedimiento se realizo una adecuada asepsia del lugar de trabajo con fenol al 5%. Posteriormente se realizo asepsia y antisepsia con jabón clorhexidina y agua estéril en la oreja y se colocaron campos estériles a cada uno de los conejos, y se procedió a la extracción sanguínea.

6.5.2 Extracción sanguínea:

Se realizo mediante la venopunción de la vena marginal de la oreja con catéter 25Fr, el volumen de muestra a extraer fue un 5% del total del volumen sanguíneo de la unidad, el cual fue recolectado en un jeringa de 10ml adicionando 1ml de citrato fosfato dextrosa por cada 5ml de sangre.

6.5.3 Realización de la injuria térmica

Cuatro plantillas cilíndricas de aluminio de 2cm de diámetro x 3.5cm de longitud, se precalentaron al mismo tiempo en un plato calentador a 200°C cada una de las plantillas hasta lograr una temperatura final de 100° C y así fue utilizada para la realización de una quemadura, de esta manera 4 plantillas serán exclusivas para la generación de la injuria térmica en cada unidad experimental.

Para la realización de la lesión térmica se parte de la energía térmica que se transfiere por conducción del elemento sólido hacia la piel y no depende de la presión empleada sino del gradiente de temperatura, lo cual será calculado con la siguiente fórmula: ⁽¹³⁾

$$Q = \frac{K \times A}{L} (T_1 - T_2) = (209.3 / 3.5) * (100 - 38.5) = 3667.7 \text{ cal/s.cm}^2$$

La lesión fue inducida mediante el contacto de la plantilla de aluminio precalentada con la piel de la unidad experimental durante 5 segundos.

6.5.4 Obtención del PRP:

Conociendo la variedad de métodos investigados por diferentes autores para obtener una mejor calidad y cantidad de PRP se implementará el uso de la centrifugación y utilización del activador del plasma que en este caso será Cloruro de Calcio.

La fase de centrifugación debe ser realizada en un ambiente controlado contando con el material apropiado para permitir la obtención de la máxima concentración de las plaquetas por unidad de volumen, sin la ruptura de las mismas. Se centrifuga el plasma con un equipo digital que garantiza que los parámetros de tiempos y velocidad son los adecuados. La velocidad de rotación depende del protocolo de obtención (un solo centrifugado o doble centrifugado) y del volumen recogido. Cualquier alteración en la estandarización del centrifugado puede producir daños estructurales en las células sanguíneas.⁽²⁸⁾

La separación de los elementos de la sangre después del proceso de centrifugación se da en función de la densidad, de mayor a menor. Existen dos protocolos:

- Única centrifugación.
- Doble centrifugación

En este último, la primera centrifugación se puede realizar a una velocidad de 1.400 rpm durante 7 minutos o bien a 1.200 rpm durante 10 minutos. Con esta primera centrifugación se consigue separar la sangre completa en una franja roja inferior de hematíes y otra amarillenta superior de plasma. Este plasma contiene una concentración relativamente baja de plaquetas (es lo que se denomina plasma bajo o pobre en plaquetas, PPP). Entre una franja y la otra se encuentra la mayor concentración de plaquetas, y recibe el nombre de franja leucocitaria, y en la franja inferior roja se encuentran los componentes celulares sanguíneos. Se extrae el plasma amarillento (PPP) del tubo de sangre con una jeringuilla y posteriormente se introduce en un nuevo tubo, se coloca el tapón del tubo de ensayo y se realiza la segunda centrifugación.⁽²⁸⁾

El objetivo de la segunda centrifugación es separar y concentrar todavía más las plaquetas obteniendo como producto final el plasma rico en plaquetas. Esta segunda centrifugación se hará a una velocidad de 2000 rpm por 8 minutos. Con este último proceso los tubos presentan una franja superior de suero sobrenadante de color amarillo claro, que contiene fibrinógeno y una concentración muy baja de plaquetas, y una franja inferior generalmente de color rojizo formada por PRP muy concentrado. Posteriormente se pipetea el suero sobrenadante y se queda un remanente de PRP de 0,5mm aproximadamente en cada tubo, dependiendo de la cantidad inicial recogida.⁽²⁸⁾

La concentración normal de las plaquetas en el hematocrito es de 33-40% de plaquetas, pero tras el proceso de doble centrifugado se puede obtener una concentración de plaquetas de 330% aproximadamente.⁽²⁸⁾ Se agregará Citrato Fosfato Dextrosa a razón de 1ml por cada 5ml de sangre con el fin de lograr la anti coagulación luego para la aplicación requiere iniciar la activación del PRP utilizando cloruro de calcio al 10%

Una jeringa de 10 ml adaptada como se detalla a continuación; por el grupo investigador la cual fue utilizada con el objetivo de evitar la contaminación y deterioro de la calidad de la sangre, la extracción se realizara de forma gradual para producir menos turbulencias sanguíneas y hacerla menos traumática para las plaquetas de la muestra y garantizar una buena calidad de PRP.

Un volumen de 5 ml por jeringa será obtenido; posteriormente se realizara la extracción de aire del cilindro, el taponamiento de la jeringa con silicona y el corte del émbolo para una primera centrifugación en centrífuga de laboratorio LW scientific, Inc lws-1524t a una velocidad de 1200rpm durante 10 minutos para eliminar los elementos más pesados (glóbulos rojos). Una vez transcurrido este tiempo se coloca la jeringa en la gradilla boca abajo, para poder distinguir dos primeras fases derivadas del peso de su contenido; una parte inferior en el cilindro con los glóbulos rojos y otra, por encima conteniendo el plasma, se eliminará el tapón y se descartará lentamente la fase correspondiente a las células rojas evitando de esta forma la contaminación de la muestra y la manipulación de las plaquetas.

Nuevamente se sello la jeringa y se inicio una segunda centrifugación a 2000 rpm por 8min(3) obteniéndose un nueva etapa de separación en el que se pudo diferenciar tres grandes fases; la primera y más cercana al tapón, con los glóbulos rojos residuales del tubo y leucocitos; una segunda fase que ocupaba aproximadamente un tercio del volumen total del plasma muy concentrado en plaquetas y una tercera fase con un contenido pobre en plaquetas, nuevamente se desecho la primera fase y se obtuvo la segunda como PRP listo para su aplicación.

6.5.5 Recuento de Plaquetas.

Los resultados que se reflejaron en éste apartado correspondieron a los datos recogidos en las muestras de experimentación que tuvieron como objetivo comparar el aumento porcentual PRP posterior a la centrifugación.

Para ello se realizaron mediciones del número de plaquetas de todas las muestras antes de procesarlas, que es lo que se denominará valores basales, y lo mismo después del procesado de las muestras.

6.5.6 Aplicación del PRP:

Una vez obtenido el plasma, el volumen efectivo se dividió en cuatro para aplicar cantidades iguales a cada lesión de los sujetos dentro del grupo experimental denominado B. La aplicación requirió iniciar el proceso activación de las plaquetas utilizando Cloruro de Calcio al 10%; se utilizaron las mismas jeringas individuales de 10 ml que contenían el prp de cada sujeto en donde se realizo la mezcla de 0.2 cc de Cloruro de Calcio al 10% por cada ml de PRP obtenido.⁽²⁶⁾

Seguido de esto se procedió a realizar la infiltración intradérmica en la zona denominada estasis de cada sujeto de estudio.

6.5.7 Cuidado periódico de las lesiones.

Los conejos en grupo A recibieron tratamiento con Sulfadiazina de plata al 1% en todas las quemaduras, previa limpieza con agua estéril y jabón clorhexidina, posteriormente las lesiones fueron cubiertas con gasa estéril y Tegaderm.

Los conejos del grupo B recibieron tratamiento en las quemaduras con plasma rico en plaquetas intradérmico +/- 0.5cc como única aplicación en cada quemadura, las cuales fueron curadas diariamente con agua estéril y jabón de clorhexidina y cubiertas posteriormente con gasa estéril y tegaderm.

Los conejos del Grupo C fueron manejados únicamente con curaciones diarias de agua estéril a presión y jabón de clorhexidina y cubiertos posteriormente con gasa estéril y tegaderm, este grupo se utilizo como control.

6.5.8 Toma de biopsia

Se realizó una biopsia al cabo de quince días se escogió una de las quemaduras al azar en cada conejo de cada grupo y fue identificada la muestra según el código del mismo. Se utilizó punch de 0.5cm tomadas del centro de la quemadura para comparar angiogénesis, reepitelización, depósitos de colágeno, presencia o ausencia de microorganismos e inflamación entre los diferentes grupos.

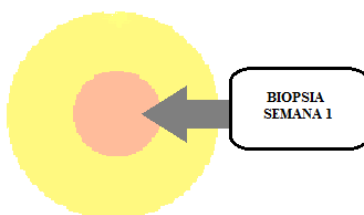


Ilustración 7 Sitio de Toma de Biopsia

6.5.9 Toma de fotografías

Cada lesión fue fotografiada macroscópicamente en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 utilizando el manual de Estandarización de Fotografía de Heridas WEMR.(33) Se utilizará una Cámara Canon profesional EOS Rebel XS de 10MP para la observación macroscópica de la quemadura.

6.5.10 Procesamiento y análisis de datos

1. Se tomaron fotografías digitales de las heridas los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15. Se utilizó Adobe Photo Shop CS3 e Image J 1.43u para el estudio de las fotografías. Se inició estableciendo una escala de referencia de longitud para obtener una relación píxeles/mm, luego se delimitó el área que se desea medir y posteriormente fue obtenida bajo la misma escala en píxeles/mm.
2. Se tomaron muestras histológicas de una de las lesiones de cada sujeto el día 15 de forma aleatoria y se estudiaron con un microscopio de luz estándar, utilizando las coloraciones de hematoxilina-eosina y coloración tricromática, así mismo fue evaluada la presencia de microorganismos por campo de observación.

Se utilizaron el programa de Microsoft Excel y el programa GRAPH PAD PRISM para el procesamiento estadístico:

Las variables correspondientes a la valoración fotográfica fueron sometidas a una prueba exploratoria de normalidad mediante el test de D'Agostino-Pearson para determinar el tratamiento como variable paramétrica o no paramétrica para ser comparadas entre grupos mediante el análisis de ANOVA al resultar paramétricas o Test de Friedman en el caso de resultar no paramétrica.

6.5.11 Consideraciones éticas

Los conejos fueron manejados bajo las regulaciones de Canadian Council Animal Care 2007 en su guía “Laboratory animal facilities - characteristics, design and development “ (34) y la “Guía de Manejo de Animales de Laboratorio: Conejos” elaborado por el Ministerio de Salud de la Republica del Perú año 2010 (31) y La eutanasia se realizo de acuerdo a lo establecido por la Canadian Council Animal Care 2007 en su guía “Euthanasia of animals used in science” (32).

VII Resultados y Análisis

7.1 Análisis de Resultados.

Se realizó conteo plaquetario automatizado de una muestra diluida al doble, el análisis se realizó por impedancia volumétrica a cada muestra, se realizó la comparación posterior de variación porcentual con respecto al análisis de sangre completa para verificar el incremento porcentual de concentración.

Valores en cada una de las muestras expresadas en número de plaquetas por milímetro cúbico de sangre multiplicado por 1000

Sujeto	Plt/mm ³	Plasma Rico en plaquetas	Porcentaje PRP	% Aumento sobre Sangre completa
1	157	532	338.8%	238.9%
2	203	686	338%	237.9%
3	276	862	312.4%	212.3%
4	149	514	345%	244.9%
promedio	196.25	648.5	333.5%	233.5%

Los valores encontrados permiten afirmar que la concentración final de plaquetas, obtenida por el método descrito en una muestra diluida al doble con respecto al conteo inicial de plaquetas en sangre completa lo que en forma aproximada puede establecer una concentración final de 330%.

La cantidad de plaquetas que se concentran con el método evaluado en este estudio podría ser suficiente para producir efectos biológicos ^{(26) (35)}. Es necesario recordar que lo más importante de un método para concentrar plaquetas es que además de concentrar altos números de las mismas permita obtener plaquetas vivas e inactivas ^{(26) (27)}

La evaluación del modelo se realizó mediante parámetros ópticos sistematizados, evaluación fotográfica y evaluación histopatológica.

La evaluación óptica sistematizada para el análisis de imágenes para los días 0, 3, 12 y 15 se realizó mediante el programa ImageJ y “Freehand” y evaluó los parámetros referentes a la granulación y lesión persistente mediante la estimación del área de quemadura y las brechas correspondientes a cada proceso.

La validación del modelo estadístico se realizó mediante el análisis exploratorio de normalidad de D'Agostino Pearson (A: $p=0.368$, B: $p=0.8489$, C: $p=0.3118$) y una posterior comparación del área de quemadura inicial de los 3 grupos (N=48) mediante ANOVA $P=0.1825$.

AREA DE QUEMADURA INICIAL. mm ²		
SULFADIAZINA	PRP	CONTROL
200	196.55	196.6
193.01	178.2	187.3
199.83	189.62	188.55
183.17	198.3	179.35
183.76	187.94	199.33
188.78	174.56	187.63
177.07	184.1	189.35
188.69	183.8	187.89
196.66	173.9	180.33
171.41	179.6	177.38
187.16	176.15	178.43
184.04	172.73	198.52
175.69	178.98	184.75
198.37	196.15	200.65
188.31	189.15	196.57
187.99	176.16	185.78

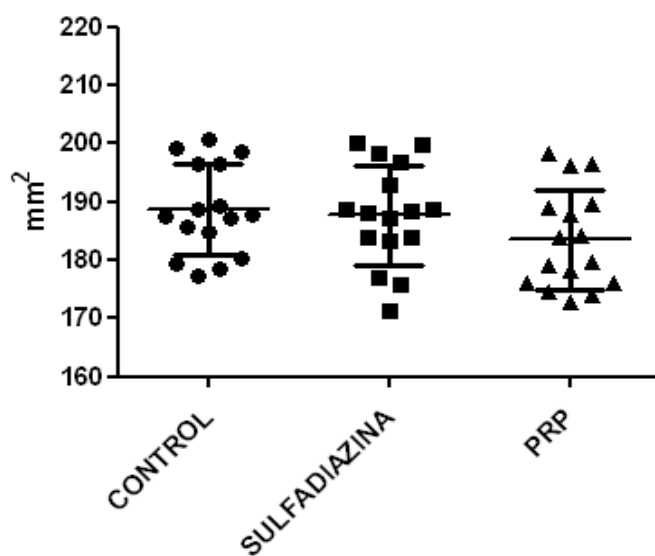


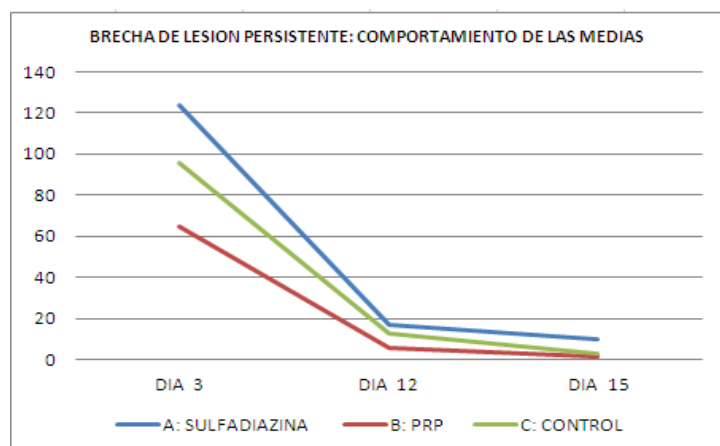
Tabla 5 Área de Quemadura Inicial

El test de normalidad de D'Agostino Pearson para las brechas de lesión persistente y epitelización en los días 3, 12 y 15 fue asimétrica (brecha de lesión persistente grupos A y B día 15 $p=0.019$ y $p=0.0149$). Lo que condujo a la estimación de diferencias mediante el test de Kruskal Wallis y Post test de análisis múltiple de DUNN'S

El comportamiento de las brechas de lesión persistente mediante Kruskal Wallis resultó significativo en los tres grupos $P < 0.001$ el post test de análisis múltiple de DUNN'S mostrando diferencias entre cada día de medición del área $P < 0.05$ en el grupo control y PRP a lo largo del tiempo, mientras el grupo Sulfadiazina expresó diferencias significativas entre los días 3 vs 12 y 3 vs 15 no así para el día 12 vs 15.

Tabla 6 Brecha de Lesión Persistente mm².

GRUPO A			GRUPO B			GRUPO C		
DIA 3	DIA 12	DIA 15	DIA 3	DIA 12	DIA 15	DIA 3	DIA 12	DIA 15
116,7	11,5	9,3	62,23	7,16	3,75	74,54	7,4	2,28
115,66	22	12,16	52,36	8,45	3,23	77,84	16,83	4,76
102,46	35	27,1	60,95	6,98	3,14	63,69	15,8	3,27
109,53	20,31	11,39	45,02	5,78	0	99,12	9,37	2,38
108,86	5,1	2,52	80,15	5,92	0	77,05	16,71	4,68
101,98	19,37	13,22	79,9	3,56	0	55,4	11,28	2,46
90,2	36,18	17,3	74,98	5,02	0	104,07	12,93	2,68
103,28	10,7	4,68	88,9	6,97	2,21	133,52	14,88	3,45
154,95	17,12	10,79	78,1	1,33	0	57,01	9,46	4,77
126,61	12,48	7,15	45,19	6,45	4	72,1	10,37	1,28
131,98	9,07	4,01	43,69	4,45	2,24	91,15	16,98	4,54
157,76	14,82	6,31	58,73	3,54	0	108,22	8,76	1,86
110,78	19,11	11,23	72,2	5,43	3,98	92,23	7,57	1,89
146,99	10,54	6,75	66,98	5,89	1,97	145,67	9,68	2,57
159,41	12,33	7,11	62,13	6,66	0	143,29	13,36	2,89
142,7	8,97	4,66	68,54	4,78	0	130,4	15,59	3,87



GRUPOS	DIA 3	DIA 12	DIA 15
A: SULFADIAZINA	123,7	16,54	9,73
B: PRP	65	5,523	1,533
C: CONTROL	95,33	12,31	3,102

Tabla 7 Media Brecha de Lesión

Las diferencias en la efectividad de grupo tratamiento para la determinación de lesión persistente se muestran a continuación:

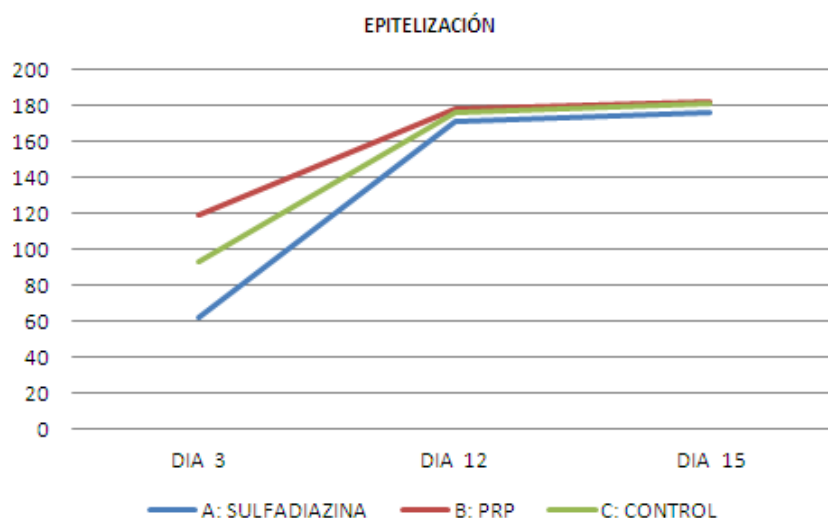
BRECHA DE LESION PERSISTENTE POR GRUPO DE TRATAMIENTO		
DIA 3	SIGNIFICANCIA	
CONTROL VERSUS SULFA	si	*
CONTROL VERSUS PLASMA	si	*
SULFA VERSUS PLASMA	si	***
DIA 12		
CONTROL VERSUS SULFA	No	ns
CONTROL VERSUS PLASMA	si	***
SULFA VERSUS PLASMA	si	***
DIA 15		
CONTROL VERSUS SULFA	si	**
CONTROL VERSUS PLASMA	No	ns
SULFA VERSUS PLASMA	si	***

Tabla 8 Interpretación Estadística Brecha de Lesión Persistente. P < 0.001 Extremadamente significativo *** 0.001 to 0.01 Muy significativo ** 0.01 to 0.05 significativo * >0.5 No significativo

La prueba de normalidad de D'Agostino Pearson para la variable correspondiente a brecha de epitelización fue superada, y su posterior comparación por ANOVA entre grupos muestra significancia estadística P<0.0001.

Tabla 9 Brecha de Epitelización mm²

GRUPO A			GRUPO B			GRUPO C		
DIA 3	DIA 12	DIA 15	DIA 3	DIA 12	DIA 15	DIA 3	DIA 12	DIA 15
83,3	187,26	190,7	134,32	189,39	192,8	122,06	189,2	194,32
77,35	174,12	180,85	125,84	169,75	174,97	109,46	170,47	182,54
97,37	154,32	172,73	128,67	182,64	186,48	124,86	172,75	185,28
73,64	169,45	171,78	153,28	192,52	198,3	80,23	169,98	176,97
74,9	187,04	181,24	107,79	182,02	187,94	122,28	182,62	194,65
86,8	179,84	175,56	94,66	171	174,56	132,23	176,35	185,17
86,87	139,25	159,77	109,12	179,08	184,1	85,28	176,42	186,67
85,41	177,99	184,01	94,9	176,83	181,59	54,37	173,01	184,44
16,46	154,29	160,62	95,8	172,57	173,9	123,32	170,87	175,56
44,8	158,93	164,26	134,41	173,15	175,6	105,28	167,01	176,1
55,18	178,09	183,15	132,46	171,7	173,91	87,28	161,45	173,89
26,28	169,22	177,73	114	169,19	172,73	90,3	189,76	196,66
64,91	156,58	164,46	106,78	173,55	175	92,52	177,18	182,86
51,38	187,83	191,62	129,17	190,26	194,18	54,98	190,97	198,08
28,9	175,98	181,2	127,02	182,49	189,15	53,28	183,21	193,68
45,29	179,02	183,33	107,62	171,38	176,16	55,38	170,19	181,91



GRUPOS	DIA 3	DIA 12	DIA 15
A: SULFADIAZINA	62,43	170,6	176,4
B: PRP	118,5	178	182
C: CONTROL	93,32	176,3	180,5

Tabla 10 Media Brecha de Epitelización

Los resultados del post test de TUKEY encuentran diferencias estadísticas significativas entre los días 3 vs 12 y 3 vs 15 $P < 0.05$ para los tres grupos







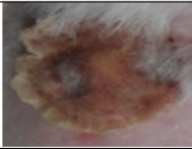



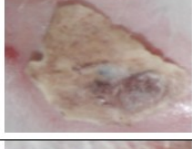







La diferencia en la efectividad de grupo tratamiento para la granulación se muestran a continuación:

BRECHA DE EPITELIZACION POR GRUPO DE TRATAMIENTO		
DIA 3	SIGNIFICANCIA	
CONTROL VERSUS SULFA	Si	**
CONTROL VERSUS PLASMA	Si	*
SULFA VERSUS PLASMA	Si	***
DIA 12		
CONTROL VERSUS SULFA	No	ns
CONTROL VERSUS PLASMA	No	ns
SULFA VERSUS PLASMA	No	ns
DIA 15		
CONTROL VERSUS SULFA	Si	*
CONTROL VERSUS PLASMA	No	ns
SULFA VERSUS PLASMA	No	ns

Tabla 11 Interpretación Estadística Epitelización $P < 0.001$ Extremadamente significativo *** 0.001 to 0.01 Muy significativo ** 0.01 to

7.2 Resultados macroscópicos

Evolución cronológica del proceso de cicatrización para los tres diferentes grupos.

Día/Grupo	SULFADIAZINA	PRP	CONTROL
Día 0			
Día 3			
Día 6			
Día 9			
Día 12			
Día 15			

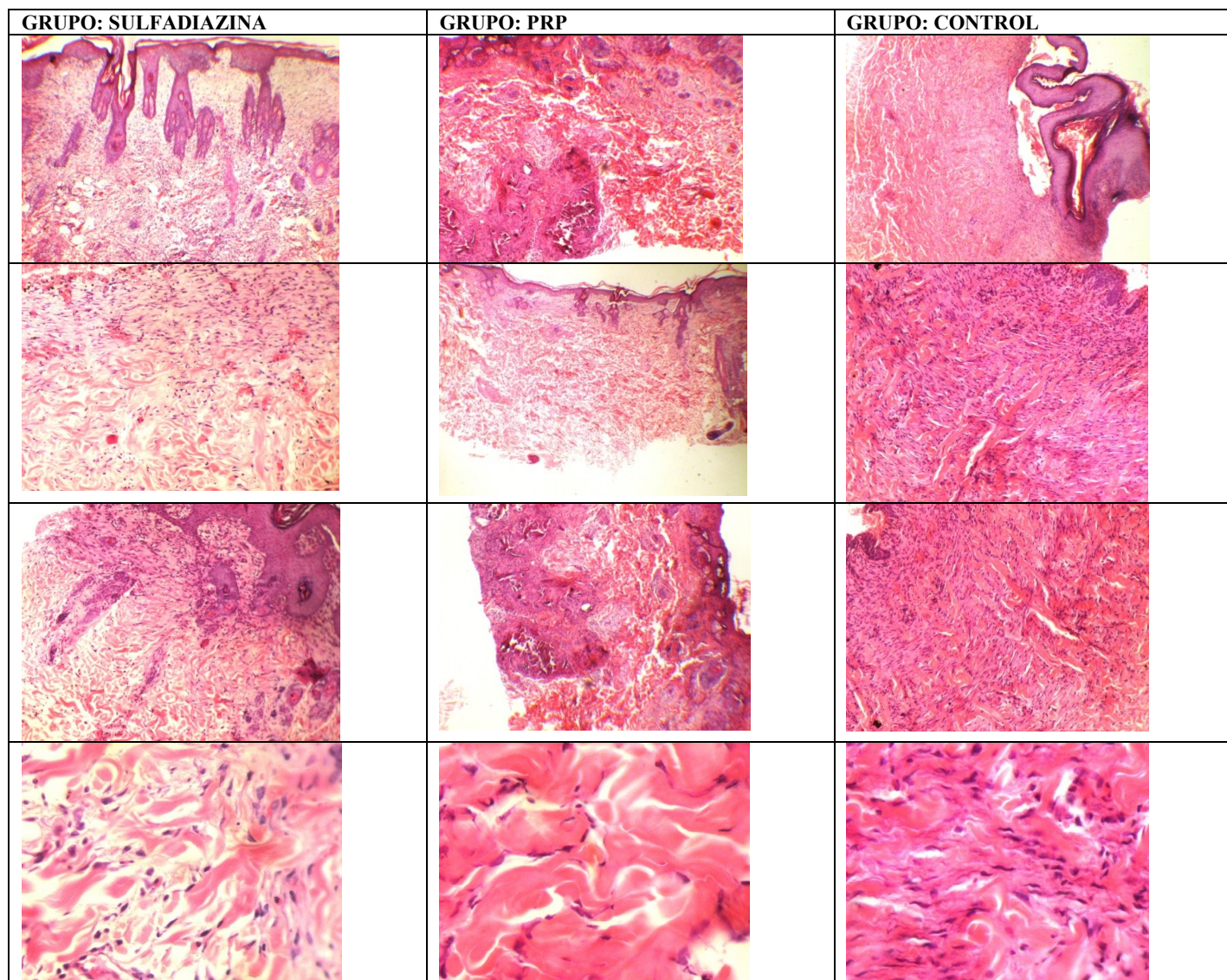
Las áreas iniciales de quemadura mostraron distribuciones normales lo que refleja la veracidad del modelo, en todos los grupos puede observarse un área de coagulación (necrosis de color blanquecino) durante el día 0, la zona de estasis no fue sujeta a evaluación dada las características del protocolo.

La zona de hiperemia fue apreciable en los tres grupos sin diferencias marcadas, mientras que su evaluación para los días 6 y 9 fue invalidada por la presencia de costra hipotrófica sobre cada una de las lesiones.

Durante el día 12 se observa desprendimiento total de la costra hipotrófica y área ulcerada de menor proporción en el grupo PRP mientras que en el grupo control es evidente la secreción serosa y la persistencia de úlcera al igual que en el grupo sulfadiazina

Para el día 15 se observa recuperación de la integridad del tejido lesionado con disminución casi total del área de la quemadura en el grupo PRP, los grupos control y sulfadiazina para esta fecha no han resuelto por completo y expresan zonas hiperémicas.

Para el análisis histopatológico se efectuó la toma de biopsia mediante la técnica primaria de punch en 1 de las 4 quemaduras realizadas a cada unidad experimental de los 3 grupos el día 15.



Hallazgos Histopatológicos generales:						
Grupo/Área	DERMIS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLAGENA	MATRIZ	INFLAMACION	VASCULARIZACION
SULFADIAZINA	Edema marcado	Proliferación	Fibras estrechas y marcada laxitud entre ellas.	Edema hemosiderina	Infiltrado Inflamatorio abundante.	Ovillos vasculares
PRP	Edema superficial Calcificación Distrófica	Poca cantidad.	Fibras de mayor espesor buen compactadas.	Normal	n/a	Capilares.
CONTROL	Compactación	Hiperplasia.	Poca cantidad	Escasa	Presente	capilares

7.3 Discusión

La agresión tisular cutánea ocasionada por variaciones térmicas locales es responsable de procesos necróticos congelativos de la epidermis y tejidos subyacentes, su profundidad dependerá de la temperatura de exposición y de la duración de la misma. Este modelo animal que hace referencia a este tipo de lesiones, reprodujo la variación térmica local mediante el precalentamiento de cilindros de aluminio a 200 °C por un periodo de 5 segundos.

La estandarización del modelo analizado estadísticamente muestra una homogeneidad en el área de quemaduras en el día 0 lo que las convierte en comparables, las características macroscópicas permitieron identificar el proceso de reparación y la posterior formación de escara, fenómeno ocurrido a todos los grupos, determinando la reproducibilidad del modelo animal.

La terapia actual de las quemaduras involucra diversos métodos, siendo el más reproducido en nuestro entorno el uso de antibióticos tópicos y el cuidado convencional de la herida (curaciones diarias), el modelo plantea una estrategia terapéutica derivada del auge del Plasma Rico en Plaquetas, terapia autóloga que hace uso de las características “regeneradoras” poseídas por el mismo debido a la presencia de diferentes factores de crecimiento que pueden estimular la regeneración del tejido dañado⁽¹⁸⁾.

Los tres grupos estudiados muestran diferencias notables $P < 0.0001$, que respaldan el efecto del tiempo sobre el proceso fisiológico de cicatrización y el efecto de cada tratamiento y sus propiedades reparadoras. Curiosamente el tratamiento convencional en nuestro entorno (sulfadiazina) parece influir negativamente en la velocidad de los procesos de reparación.

Las diferencias estadísticas observadas en los tres grupos destacan una notable efectividad de epitelización para el grupo PRP con respecto al grupo Sulfadiazina y el Control en los primeros días de evaluación (días 3 y 12) hasta donde se alcanza una etapa de estancamiento en la tendencia ascendente de los grupos y se describe una meseta para todos los grupos en los tres últimos 3 días del proceso en donde los grupos sulfadiazina y control no lograron un 100% de cicatrización. (ver tabla 10)

Se ha descrito que la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas son necesarios para iniciar el proceso de reparación.⁽¹⁾ Y se conoce que por la aplicación de PRP autólogo no solo se apoya la cicatrización en heridas al potenciar la angiogénesis, proliferación de fibroblastos y colágeno ⁽³⁶⁾ sino también optimiza el proceso de regeneración en los tejidos dañados.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas liberado es importante en el inicio del proceso de cicatrización al generar y facilitar la quimiotaxis de células inflamatorias y la activación de macrófagos, el Factor de Crecimiento Transformador aumenta las proteínas de la matriz extracelular; el aumento de su concentración mejora los procesos fisiológicos reparadores de la herida con lo que acelera el proceso de cicatrización⁽¹⁾

El progreso reparador del Grupo tratado mediante plasma rico en plaquetas es constatado por su menor brecha de lesión persistente y mayor progreso en el proceso de epitelización observado un pico de actividad que se relaciona con la vida media de las plaquetas (7 a 10 días). Ver tabla 11.

Medina et al en el año 2000 realizó un estudio con un total de 24 pacientes quemados implementando la aplicación de adhesivo plaquetario en el cual mostró diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados mediante plasma rico en plaquetas para los días 3, 6, 9, 12 y 15 para los parámetros de reepitelización tal y como se observó en el desarrollo de este trabajo.⁽¹⁾

Al concluir la cuantificación de lesiones en cada grupo, las unidades experimentales tratadas con PRP obtuvieron una cicatrización completa en el 50% de las lesiones, mientras que para los grupos control y Sulfadiazina ninguna lesión mostró un proceso cicatricial finalizado. (Ver tabla 6)

Dentro de la evaluación histopatológica existió un hallazgo casual de calcificación distrofica lo que pudiera atribuirse a activación plaquetaria mediante la utilización de cloruro de calcio, sin embargo se encuentra descrito⁽³⁷⁾ que el calcio posee propiedades antiinflamatorias y por lo tanto se pudiera estar manifestándose dentro del proceso normal, lo que se refleja en el reporte de patología del grupo B en donde se reporta un escaso edema dérmico.

El análisis de los resultados para el grupo tratado con sulfadiazina hace pensar que su utilidad debería estar limitada a la protección antibacteriana, sin embargo los parámetros de regeneración parecen verse afectados de forma negativa en el modelo propuesto observándose en la tabla 6 que para la finalización del estudio la brecha de epitelización del grupo sulfadiazina permanecía incompleta y permiten afirmar como otros estudios que su utilización como estándar de oro en el tratamiento de las quemaduras debe ser “repensado” pues estudios que afirman que sus componentes son responsables del retraso del proceso de cicatrización y poseen actividad citotóxica en varias células.⁽³⁷⁾

Los beneficios asociados al uso de la Sulfadiazina son: la reducción local de la metaloproteinasas y el mejoramiento de la apoptosis celular de la matriz a la vez parece incrementar los niveles de calcio quien experimentalmente que posee potentes propiedades antiinflamatorias.⁽³⁷⁾

El retraso en la separación de la costra hipotrófica visto en el grupo sulfadiazina también posee sustento en la literatura médica, en donde Maghsoudi et al 2010 reportan procesos de más de tres semanas con resultantes en cicatrices hipertróficas⁽³⁷⁾ con la probabilidad agregada de presentar agriria.

El grupo Control presentó una contracción más acelerada con respecto al grupo Sulfadiazina ($P < 0.0001$) lo que respalda los hallazgos de estudios referidos anteriormente, permitiendo concluir que la sulfadiazina de plata retarda el proceso y tiene efectos deletéreos en la cicatrización de las quemaduras.

El proceso de cicatrización y reparación en las quemaduras fue analizado mediante el estudio de una biopsia de la zona central de una de las lesiones de cada sujeto experimental elegido al azar.

En todos los grupos se observaron hallazgos concordantes con el proceso de cicatrización normal, evidenciando neoformación de vasos, presencia de colágeno, matriz extracelular y fibroblastos, sin embargo las características y organización de cada uno de los procesos en los diferentes grupos muestran diferencias notorias. (Ver tabla 13)

Los cortes histológicos muestran mejoría en la madurez y conformación de las fibras de colágeno de los cortes de sujetos tratados con PRP, presentan mayor espesor y compactación; escaso edema de la matriz

extracelular y se advierte una menor cuantía de fibroblastos, lo que traduce menor fibrosis en la cicatriz final y una semejanza al tejido original una vez cicatrizado.

El resto de los grupos muestran pobre espesor del colágeno, abundante edema y escasa matriz extracelular con un notable incremento de fibroblastos en el grupo control con tejido compactado y una cicatrización de menor calidad y tejido frágil e inestable.

VIII CONCLUSIONES

- La aplicación de plasma rico en plaquetas en este modelo de quemaduras de segundo grado, permite demostrar su efectividad e influencia positiva sobre los parámetros de epitelización y disminución de la brecha de lesión persistente.
- El modelo animal de quemaduras de segundo grado propuesto, el método de extracción y el manejo del plasma rico en plaquetas demuestra ser idóneo y se refleja en la independencia y comportamiento del grupo control durante la fase experimental.
- El uso generalizado de la sulfadiazina en quemaduras debe ser revisado en base a estudios en humanos, los resultados de este trabajo y la evidencia disponible reafirman su efecto deletéreo sobre los procesos de cicatrización y citotoxicidad.
- No se observaron microorganismos en los cortes histopatológicos de los tres grupos por lo que no se le puede atribuir propiedades antimicrobianas al PRP basados únicamente en estos hallazgos.

IX RECOMENDACIONES:

- Utilizar en futuros modelos sujetos experimentales de mayor peso y volemia para una mejor aplicación del modelo.
- Se sugiere la aplicación periódica de plasma rico en plaquetas en varios momentos con el fin de observar la influencia que tiene sobre los periodos de meseta y no significancia de los otros grupos.
- Se sugieren estudios de aplicación de PRP en seres humanos con lesiones térmicas para reconfirmar los resultados y experiencia obtenida.

BIBLIOGRAFIA

1. Abelardo Medina. Aplicación de Adhesivo Plaquetario autólogo: Mejora cicatrización en pacientes quemados. Boletín Científico Asociación Chile de Seguridad. 2000 Jun;:26–30.
2. My. Teresita Montero González M, Ing Patricio Moreno Quintana, Dr. Jorge Berlanga Acosta, Tte. Cor. José Hurtado de Mendoza Amat, Lic. Dania Bacardi Fernández, Tec. Diosladia Urquiza Noa, et al. Modelo experimental de ratón quemado en investigaciones biomédicas. Revista Cubana Medicina Militar. 2003;32:94–102.
3. Antonio Lorente Pérez-Sierra. Estudio de Microscopía Electrónica y Cuantificación de los Factores de Crecimiento Mediante un Nuevo Procedimiento de Obtención de Plasma Rico en Plaquetas Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2010. 163 p:
4. Pan American Health Organization. De la teoría a la práctica: Indicadores de Salud Ambiental Infantil Implementación de una iniciativa lanzada en la Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible
5. Kristen Davidge, Joel Fish. Older adults and burns: Epidemiology. Geriatrics and Aging. 2008;11:270–5.
6. Ministerio de Salud Nicaragua. Situación de las Quemaduras en 5 hospitales del país, Enero 2003-Marzo 2004. 2005 Ago 21;
7. COANIQUEM [Internet]. 2009;Available from: http://www.asiquim.cl/web/documentos/Reciclaje_ago_2009.pdf
8. Armand Versaci, Garry Brody, Dra. Diana Forno-Batres, Dra. Ivette Icaza. MEDICOS por la PAZ Programa de Rehabilitación de Quemaduras San Salvador, El Salvador 1-3 de febrero, 2007
9. F. Charles Brunicki, MD, Dana K. Andersen, MD, Timothy R. Billiar, MD, David L. Dunn, MD, Ph. D, John G. Hunter, MD, F.A.C.S, Raphael E. Pollok, MD, F.A.C.S. Schwartz: Principios de Cirugía. 8o ed. McGraw-Hill; 190,193-198,223-228 p.
10. Richard Behrman, Robert Kliegman, Hal Jenson. Nelson Tratado de Pediatría. 17o ed. España: Elsevier; 2006. 330 p.
11. A. Bendlin, H. Linares, F. Benaim. Tratado de Quemaduras. Mexico: McGraw-Gill; 1993. 117, 123 p.
12. Courtney Townsend, R. Daniel Beauchamp, B. Mark Evers, Kenneth L. Mattox. Sabiston Tratado de Cirugía. 17o ed. España: Elsevier; 2007. 570-571, 576-577 p.
13. Kaufman T, Lusthaus SN, Sagher U, Wexler MR>. Deep partial skin thickness burns: a reproducible ... [Burns. 1990] - PubMed result. Burns. 1990;16(1):13–6.
14. Jeffrey W. Shupp, Teresa J. Nasabzadeh, Dean S. Rosenthal, Marion H. Jordan, Philip Fidler, James C. Jeng. A Review of the Local Pathophysiologic Bases of Burn Wound Progression. Journal of Burn Care & Research. 2010 Dic;31:849–73.

15. Hettiaratchy Shehan, Dziewulski Peter. ABC of burns Pathophysiology and types of burns. British Medical Journal. 2004 Jun 12;328:1427–9.
16. Barin Bose. Burns, Medical and Surgical Management of Burns. Burns and its management. [citado 2011 May 6]; Available from: <http://www.indiasurgeons.com/burns.htm>
17. Jorge Quant, Willy Corn, Ruben Abrego, Jaime Torres, Ricardo Flores. Guía del manejo de cirugía plástica ISSS. El salvador: 2004. 58,60 p.
18. Robert Beasley, Sherrell J. Aston, Scott P. Bartlett, Geoffrey C. Gurtner, Scott L. Spear. GRABB AND SMITH'S Plastic Surgery. 6o ed. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 133-137,140-141 p.
19. Hernandez C Mayra C. Infección local en la unidad de quemados - Revista Electrónica de PortalesMedicos.com 2009 Jul:
20. Rozman P, Bolta Z. Use of Platelet Growth Factors in Treating Wounds and Soft-Tissue Injuries. Acta Dermatoven APA. 2007;16(No4):156–65.
21. Marini MA. Consenso Sobre Cicatrización de Heridas. 2008
22. Leslie P. Gartner. Texto Atlas de Histología. Matriz Extracelular; Fibras de Colágena estructura y Función, 75p
23. Garcia Mesa M, Coma Alfonso. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Revista Cubana Angiología y Cirugía Vascular. 2000 Jun 5;1:132–41.
24. Nagata MJH, Messori MR, Furlaneto LAC, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. European Journal Of Dentistry. 2010 Oct;4:395–402.
25. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems - Leitner - 2006 - Vox Sanguinis - Wiley Online Library. Vox Sanguinis. 2006 Ago;91(2):135–9.
26. Carmona Ramirez JU. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. Universidad Autónoma de Barcelona; 2006. 100 p:
27. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2004;62:489–96.
28. Beca T, Hernandez G, Morantes S, Bascones A. Plasma Rico en Plaquetas. Una revision bibliográfica. AVANCES EN PERIODONCIA. 2007 Abr;19(1):39–52.
29. Carrasco J, Bonete D, Gomar F. Plasma Rico en Plaquetas vr, Plasma rico en Factores de Crecimientos. Revista Española de Cirugía Osteoarticular. 2009 Sep;36(239):127–37.
30. David Ferj B. Quemaduras en edad pediátrica: Enfrentamiento inicial. Revista Médica Clínica Condes. 2009;:849–59.
31. Cesar Cabezas Sanchez y colaboradores. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos.2010;

32. Subcommittee on euthanasia of the Canadian Council on Animal Care. Euthanasia of animals used in science.
33. Rennert R, Golinko M, Flattau A, Brem H. Standardization of Wound Photography Using the Wound Electronic Medical Record. *Advances in skin and wound care*. 2008;22.
34. CCAC Facilities Standards Subcommittee. Guidelines on: Laboratory Animal Facilities — Characteristics, Design and Development.
35. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The harvest smart PRePTM system versus the friadent-schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003;04(14(2)):233–9.
36. Pallua N, Markowicz M, Wolter T. Platelet-Rich Plasma in Burns. Elsevier Ltd and ISBI. 2010;36:4–8.
37. Maghsoudi, H. Monshizadeh, S. Mesgari, M. A Comparative Study of the Burn Wound Healing Properties of Saline-Soaked Dressing and Silver Sulfadiazine in Rats. 2010 Nov 18